



**SINTESA GALAKTO-OLIGOSAKARIDA SECARA
ENZIMATIS MENGGUNAKAN ENZIM
 β -GALAKTOSIDASE ASAL *Bacillus circulans***

**KARYA ILMIAH TERTULIS
(SKRIPSI)**

**Diajukan guna memenuhi salah satu syarat untuk
menyelesaikan Pendidikan Program Strata Satu
Jurusan Teknologi Hasil Pertanian
Fakultas Teknologi Pertanian
Universitas Jember**

Oleh :

FRIDA NURMA ZAHNIA

NIM. 971710101039

**FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER**

JUNI, 2001

Asal : *Handwritten*
Terima : *Handwritten*
No. Induk : 10236062
Klass
574.192
JUL 2001 ZAH
5

Digital Repository Universitas Jember

Diterima Oleh:

Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember

Sebagai Karya Ilmiah Tertulis (Skripsi)

Dipertahankan pada :

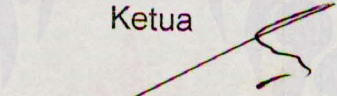
Hari : Kamis

Tanggal : 14 Juni 2001

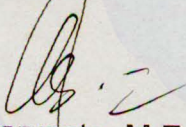
Tempat : Fakultas Teknologi Pertanian
Universitas Jember

Tim Penguji


Ketua


Dr. Ir. Sony Suwasono, M.App.Sc
NIP.131 832 332

Anggota I,


Dr. Ir. Maryanto, M.Eng
NIP.131 276 660

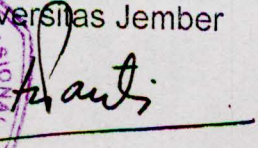
Anggota II,


Ir. Giyarto, M.Sc
NIP.132 052 412

Mengesahkan.

Dekan Fakultas Teknologi Pertanian
Universitas Jember




Dr. Hj. Siti Hartanti, MS.
NIP.130 350 763

DOSEN PEMBIMBING

1. Dr.Ir. SONY SUWASONO, M.App.Sc (DPU)
2. Dr.Ir. MARYANTO, M.Eng (DPA)

MOTTO :

1. ***KHOSBUNALLAH WANIKMAL WAKIL*** (Cukuplah ALLAH sebagai PENOLONGku).
2. *“Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan. Maka apabila kamu telah selesai dari suatu urusan, kerjakanlah dengan sungguh-sungguh urusan yang lain dengan sungguh-sungguh dan hanya kepada Allah hendaknya kamu berharap.”*
(Q.S.Al-Insyiraah,5-8)
3. *“Janganlah takut akan kehidupan! Alam hanya akan mengukur kekuatannya dengan kelemahan manusia. Tetapi ada Yang Maha Kuasa di atas hujan salju dan gumpalan awan, di balik sapuan badai dan petir taufan, Dia Maha Tahu akan kebutuhan bumi ini, sebab Dia jua yang membuatnya, dan si lemah pun dipandang-Nya lembut dengan iba.”*
(Kahlil Gibran)
4. *Kehidupan itu suatu tekad keputusan
Yang menyertai keremajaan,
Dan suatu kerajinan yang mengikuti kedewasaan.

Ilmu Pengetahuan itu Cahaya,
Yang memperkaya kehangatan kehidupan, dan siapa saja boleh mencarinya.

Peri kemanusiaan adalah sungai yang cemerlang
Yang bersenandung dalam perjalanan yang riang. Membawa bersamanya rahasia gunung yang dialirkan ke dalam jantung Samudra.*
(Kahlil Gibran)
5. *“Apabila umatku membesarkan dunia, dicabutlah daripadanya kebesaran Islam dan apabila dia meninggalkan amar ma’ruf dan nahi munkar, diharamkan baginya akan keberkatan wahyu.”*
(Riwayat Tirmidzi)
6. *“Empat macam yang tidak kenyang dari yang empat macam, ialah: Bumi daripada air hujan. Perempuan daripada laki-laki. Mata dari memandang. Dan orang yang berilmu daripada ilmunya.”*
(Riwayat Hakim)

I Dedicated This For :

1. My Beloved, **MAMA** "SITI BINTARI TAMPILANG" and **PAPA** "MOHAMAD ZAINI", *every moment spent with you is the moment of treasure. When I'm in your arms, I know that I was blessed. You are my angel !!!*
2. My **Brother** and **Sister in Law** "YULIUS NURDIN & FERIAL" , My Beloved **Sister** "WENI RIZA UMMAMI", and My **Nephew** "REINIER DINAR MARSHA", *Thanks for supporting and loving me. You are the beauty of heaven for me !*
3. My **Grandma** "TUMINI" & "FARHANA", *Your Bless always make me strong.*
4. My **Late Grandpa** "ADNAN TAMPILANG" & "ASBA'I", *who have been peacefully resting in the heaven. I wish them a marvellous place by The GOD.*
5. My **Soulmate** To Be. *You are the tribute from Paradise. I'm always close to you, just feeling your heart beating !*

Syukur Alhamdulillah penulis haturkan ke Hadirat Allah S.W.T. atas terselesaikannya Karya Ilmiah Tertulis (SKRIPSI) yang berjudul : **SINTESA GALAKTO-OLIGOSAKARIDA SECARA ENZIMATIS MENGGUNAKAN β -GALAKTOSIDASE ASAL *Bacillus circulans***. Karya Ilmiah Tertulis ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan Pendidikan Program S-1 pada Fakultas Teknologi Pertanian Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Universitas Jember.

Pada kesempatan ini penulis dengan tulus hati menyampaikan terima kasih kepada :

1. Ibu Ir.Hj.Siti Hartanti, MS., selaku Dekan Fakultas Teknologi Pertanian.
2. Bapak Dr.Ir. Sony Suwasono, MAppSc. , selaku Dosen Pembimbing Utama yang telah dengan sabar hati memberikan bimbingan dan koreksi selama penelitian dan penulisan skripsi ini.
3. Bapak Dr.Ir.Maryanto, MEng. , selaku Dosen Pembimbing Anggota I yang banyak memberi bimbingan dan koreksi sampai terselesaikannya penulisan skripsi ini.
4. Bapak Ir.Giyarto, MSc., selaku Dosen Pembimbing Anggota II, yang telah mamberikan kritik dan koreksi terhadap penulisan skripsi ini.
5. Bapak Ir. Setyo Harri, MS., dan Bapak Ir.Muharyo selaku Dosen Wali yang selalu memberi arahan dan motivasi selama ini.
6. Teknisi Laboratorium : mbak Widi dan mas Mistar, serta Tenaga Akademis mbak Sri dan mas Dwi, terima kasih atas bantuannya.
7. My *litlle* "Arsyi", you make my life full of happiness, thanks!!!
8. My Best friends: ling, Tweety, 'Oni. For about four years I've spent with you, it has been very impressing moment. Peace forever yach !!!
9. Semua Keluarga besar Tampilang di Manado dan Keluarga Besar Asba'i di Jember. Mbak Ayoenk, mbak Ninik, Hany, dik Bram and all of my first cousin, my aunt and uncle, terima kasih atas kebersamaan dan motivasi yang diberikan.

10. Terima kasih banyak boeat “Mah Mink”, “Lek Bas”, dan “Mak Mar”, yang telah banyak membantuku selama studi.
11. Temenku *seperjuangan* “Eka Ruri Ani”, ojo lali kenangan manis di Kota Gudeg bersamaku yo !!!
12. Special thanks to mas “Ari Himawan” ,who always has time for helping me. Bapak-Ibu “Sutarto”, yang telah memberi banyak kemudahan selama penelitian di UGM.
13. Terima kasih juga boeat mas Subhan atas materi Duncan-nya !, mas Agus (gojlokannya nggak ku....ku!!), mas Ngesti yang baik dan pendiam.
14. Temen-temen THP angkatan '97, Narto, Nafi', Eva, Usriatin, Ito', Wiwid, Utami, Vera, Pipit, Yanti, Ari, Wahyu, Dadang, dan semuanya. Dik Ahjab dan dik Agung, belajar yang rajin ya! serta Sobat KKN Gelombang I (tahun 2000) Kelompok 50-Desa Kertosari, I love you all.
15. Thanks for mas Helmi, you always give me support. You're really a kind man !!. Juga Irvan yang super cool (temen es-em-pe yang baru kenal sekarang), makasih atas buku “Kahlil Gibran”-nya ya!!
16. Buat mbak Santi yang cerewet, makasih udah jadi psikiaterku! Boeat mbak Fitri yang super menyenangkan, I'll miss you yach! Juga A'an dan mas “Double-B”, makasih atas sanjungannya yang selangit !
17. Boeat Eny and semua sobat SMA-ku, juga Sigit arek ITS yang jauh-jauh dateng buat nungguin aku ujian, makasih atas doanya.

Penulis sadar akan masih banyaknya kekurangan dalam penulisan skripsi ini, meski demikian penulis berharap semoga skripsi ini dapat memberikan tambahan pengetahuan dan manfaat bagi kita semua, amin.

Jember, Juni 2001

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN DOSEN PEMBIMBING	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERSEMBAHAN	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
RINGKASAN	xiv
I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Permasalahan	5
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.4 Kegunaan Penelitian	5
II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Makanan Fungsional	6
2.2 Prebiotik dan Probiotik	7
2.2.1 Prebiotik	7
2.2.2 Probiotik	9
2.3 Oligosakarida dan Galaktooligosakarida	11
2.3.1 Oligosakarida	11
2.3.2 Galaktooligosakarida	12
2.4 Reaksi Sintesa Oligosakarida oleh Enzim β -Galaktosidase	13
2.5 Hipotesis	17

III. BAHAN DAN METODE PENELITIAN

3.1 Bahan dan Alat Penelitian	18
3.1.1 Bahan	18
3.1.2 Alat Penelitian	18
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	18
3.3 Metode Penelitian	19
3.3.1 Sintesa Homo-GalaktoOligosakarida (Homo-GalOS)	19
3.3.2 Sintesa Hetero-GalaktoOligosakarida (Hetero-GalOS)	20
3.3.3 Rancangan Percobaan	21
3.4 Pengamatan	22
3.5 Prosedur Analisis	22
3.5.1 Analisa GalOS dengan HPLC	22
3.5.2 Analisa Struktur GalOS dengan GC-MS	23

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengaruh Jenis dan Konsentrasi Substrat	25
4.1.1 Substrat Galaktosa	28
4.1.2 Substrat Laktosa	32
4.2 Pengaruh pH	35
4.3 Sintesa Heterogalakto-Oligosakarida	43
4.4 Struktur Homo-GalOS dan Hetero-GalOS	45

V. KESIMPULAN DAN HASIL

5.1 Kesimpulan	49
5.2 Saran	50

DAFTAR PUSTAKA

LAMPIRAN

DĀFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Oligosakarida, disakarida, dan Poliol yang Dapat Meningkatkan Bifidobakteria dan Bakteri Asam Laktat dalam Saluran Pencernaan	2
2. Perbandingan Besarnya Produk Disakarida dan Trisakarida Pada Reaksi Sintesa oleh Enzim β -Galaktosidase asal <i>Bacillus circulans</i>	28
3. Uji Beda Pengaruh Konsentrasi Substrat Galaktosa dalam Produksi Disakarida	28
4. Uji Beda Pengaruh Konsentrasi Substrat Galaktosa dalam Produksi Trisakarida	29
5. Uji Beda Pengaruh Konsentrasi Substrat Laktosa dalam Produksi Disakarida	32
6. Uji Beda Pengaruh Konsentrasi Substrat Laktosa dalam Produksi Trisakarida	33
7. Sidik Ragam Pengaruh pH pada Konsentrasi Substrat Laktosa dalam Produksi Disakarida	36
8. Pengaruh pH pada Substrat Laktosa dalam Produksi Disakarida dengan Waktu Inkubasi 24 jam	37
9. Sidik Ragam Pengaruh pH dan Konsentrasi Substrat Laktosa dalam Produksi Trisakarida	37
10. Pengaruh pH pada Substrat Laktosa dalam Produksi Trisakarida dengan Waktu Inkubasi 24 jam	38
11. Sidik Ragam Pengaruh pH dan Konsentrasi Substrat Galaktosa dalam Produksi Disakarida	38
12. Pengaruh pH pada Substrat Galaktosa dalam Produksi Disakarida dengan Waktu Inkubasi 24 jam	39
13. Sidik Ragam Pengaruh pH dan Konsentrasi Substrat Galaktosa dalam Produksi Trisakarida	39

14. Pengaruh pH pada Substrat Galaktosa dalam Produksi Trisakarida dengan Waktu Inkubasi 24 jam	40
15. Besarnya Homo-GalOS yang dihasilkan dari Substrat Galaktosa (50%) dan Laktosa (50%) pada pH 6.0 dan 7.0 dalam Waktu Inkubasi selama 3-144 jam.....	42
16. Hetero-GalOS Hasil Sintesa oleh Enzim β -Galaktosidase dari <i>Bacillus circulans</i>	44
17. Estimasi Struktur Homo-GalOS Hasil Sintesa dari Laktosa dan Galaktosa sebagai Substrat	48
18. Estimasi Struktur dari Hetero-GalOS Hasil Sintesa oleh β -Galaktosidase dari <i>Bacillus circulans</i>	48

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Diagram Alir Sintesa Homo-GalOS oleh Enzim β -Galaktosidase asal <i>Bacillus circulans</i>	20
2. Diagram Alir Sintesa Hetero-GalOS oleh Enzim β -Galaktosidase asal <i>Bacillus circulans</i>	21
3. Diagram Alir Proses Purifikasi GalOS dengan Metode LPC	24
4. Histogram Perbedaan Kemampuan Substrat Laktosa dan Galaktosa dalam Memproduksi Disakarida dan Trisakarida	26
5. Kumpulan Grafik Disakarida dan Trisakarida yang Dihasilkan Oleh Substrat Galaktosa pada pH 6.0 dan 7.0 dalam Waktu Inkubasi 0-144 jam	30
6. Kumpulan Grafik Disakarida dan Trisakarida yang Dihasilkan Oleh Substrat Galaktosa pada pH 6.0 dan 7.0 dalam Waktu Inkubasi 0-144 jam	34
7. Grafik Produksi Disakarida dan Trisakarida dengan Substrat Galaktosa pada pH 6.0 dan 7.0	40
8. Grafik Produksi Disakarida dan Trisakarida dengan Substrat Galaktosa pada pH 6.0 dan 7.0	41

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran

1. Hasil Produksi Homo-Galaktooligosakarida (ppm) Oleh Enzim β -Galaktosidase asal *Bacillus circulans* dengan Substrat Galaktosa dan Laktosa (20%-50% g/ml), pada pH 6.0 dan 7.0 dengan Waktu Inkubasi 3,6,9,24,48,96, dan 144 jam.
2. Hasil Produksi Hetero-Galaktooligosakarida (ppm) Oleh Enzim β -Galaktosidase asal *Bacillus circulans* dengan Substrat Galaktosa (gula donor) dan Glukosa, Mannosa, Maltosa, dan Sukrosa (gula aseptor), dengan Konsentrasi Total Gula 50% g/ml, pada pH 6.0 dan 7.0 selama Waktu Inkubasi 3,6,9,24,48,96, dan 144 jam.
3. Kurva Standard Disakarida (Laktosa) dan Trisakarida (Raffinosa).

“SINTESA GALAKTO-OLIGOSAKARIDA SECARA ENZIMATIS MENGGUNAKAN ENZIM β -GALAKTOSIDASE ASAL *Bacillus circulans*”, 50 halaman, disusun oleh FRIDA NURMA ZAHNIA (971710101039), Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Universitas Jember, dibawah bimbingan Dr.Ir.Sony Suwasono,M.App.Sc sebagai dosen Pembimbing Utama dan Dr.Ir.Maryanto,M.Eng sebagai Dosen Pembimbing Anggota.

RINGKASAN

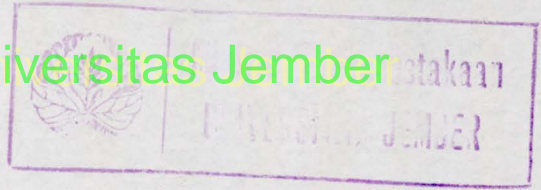
Bifidobacteria merupakan kelompok bakteri bermanfaat yang banyak tumbuh dalam usus besar bersama bakteri *Lactobacillus*. Bakteri ini mampu menggunakan galaktooligosakarida sebagai substrat. Ketersediaan sakarida ini dalam tubuh seringkali kurang mencukupi untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan *Bifidobacteria*. Produksi galaktooligosakarida dapat dilakukan secara enzimatik dengan menggunakan enzim β -galaktosidase dari *Bacillus circulans*, dalam substrat laktosa dan galaktosa. Untuk meningkatkan produksi galaktooligosakarida diperlukan komposisi dan kondisi keasaman substrat yang sesuai untuk aktivitas enzim.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh konsentrasi substrat dan pH serta waktu inkubasi dalam memproduksi galaktooligosakarida dengan enzim β -Galaktosidase dalam mensintesa galaktooligosakarida yang paling maksimal.

Penelitian ini dilakukan dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) secara faktorial menggunakan 2 faktor yaitu faktor konsentrasi substrat (C) dan faktor pH larutan substrat (faktor P). Faktor C yaitu 20%, 30%, 40%, 50% (g/ml), dan faktor P yaitu pH 6.0 dan pH 7.0, dengan dua kali ulangan. Gula substrat yang digunakan meliputi laktosa, galaktosa, glukosa, mannososa, maltosa, dan sukrosa. Parameter pengamatan penelitian meliputi kadar dan struktur galaktooligosakarida, yang diamati dalam periode waktu inkubasi tertentu.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi dan pH substrat, serta waktu inkubasi berpengaruh terhadap jumlah dan atau bentuk GalOS yang dihasilkan, baik pada substrat galaktosa maupun laktosa. Semakin tinggi konsentrasi substrat, akan dihasilkan GalOS yang lebih banyak dimana substrat laktosa memberikan produk yang lebih besar daripada galaktosa. Bentuk galaktooligosakarida yang dihasilkan berupa disakarida dan trisakarida, dimana bentuk disakarida lebih banyak diproduksi dibandingkan bentuk trisakarida. Perlakuan pH substrat (pH 6.0 dan 7.0) berpengaruh terhadap struktur galaktooligosakarida yang dihasilkan, namun kurang berpengaruh terhadap produktivitas enzim. Lama inkubasi berpengaruh terhadap produktivitas enzim, dimana produktivitas meningkat sampai lama inkubasi 24 jam kemudian cenderung stabil.

Pada sintesa hetero-GalOS, diketahui bahwa galaktosa sebagai donor mampu berikatan baik dengan gula-gula aseptor. Enzim β -Galaktosidase asal *Bacillus circulans* menunjukkan spesifikasi regioselektif yang tinggi dalam membentuk ikatan β -1,4- galaktosidik baik dalam produk homo-GalOS maupun hetero-GalOS. Spesifitas ini cenderung terbentuk ketika galaktosa (donor) berikatan dengan glukosa (aseptor).



I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Dewasa ini, hampir di seluruh dunia terutama di negara maju, terdapat kecenderungan konsumen dalam mengkonsumsi suatu makanan tidak hanya menilai dari segi gizinya serta lezat tidaknya suatu produk, tetapi juga mempertimbangkan segi pengaruh makanan tersebut pada kesehatan tubuhnya (Muchtadi dan Wijaya, 1996).

Oleh karena itu kini fungsi pangan tidak lagi dua tetapi tiga macam. Setelah fungsinya sebagai penunjang zat-zat bagi tubuh dan pemuas mulut dengan citarasanya, pangan dituntut juga berfungsi untuk menjaga kesehatan dan kebugaran tubuh (Muchtadi dan Wijaya, 1996) atau menurunkan efek negatif dari suatu penyakit tertentu, dan bahkan kalau mungkin dapat menyembuhkan.

Merancang pangan fungsional didasarkan atas kebutuhan konsumen untuk menunjang kesehatannya, yang kemudian dipadukan dengan pengetahuan mengenai komponen aktif yang terkandung dalam bahan (bahan pangan maupun nonpangan, zat gizi maupun non gizi). Produk-produk susu fermentasi juga dikategorikan sebagai makanan fungsional yang dengan pengembangan teknologi terus mengalami penyempurnaan sehingga proses produksinya semakin terkendali baik.

Manfaat kesehatan produk-produk fermentasi juga diperoleh akibat terbawanya bakteri-bakteri hidup ke dalam saluran pencernaan yang mampu memperbaiki komposisi mikroflora usus sehingga mengarah pada dominasi bakteri-bakteri yang menguntungkan kesehatan (sebagai probiotik).

Bifidobakteria dan Laktobasili merupakan bakteri-bakteri fermentasi yang keberadaannya di dalam saluran pencernaan mampu memberi sumbangan bagi kesempurnaan proses fisiologis tubuh dan manfaat-manfaat kesehatan. Upaya-upaya yang dapat dilakukan untuk

mempertahankan dominansi bakteri-bakteri bermanfaat antara lain adalah dengan mengendalikan sumber-sumber gula yang bermanfaat bagi metabolisme bakteri-bakteri tersebut atau secara langsung memberi masukan bakteri hidup.

Sumber karbon dan energi bakteri-bakteri di dalam usus besar berasal dari karbohidrat yang berasal dari sekresi tubuh atau dari karbohidrat yang tidak tercerna dalam usus halus, seperti oligosakarida. Akibat masukan oligosakarida, jumlah bifidobakteria justru berlipat ganda, sehingga oligosakarida berpotensi untuk dimanfaatkan dalam pengembangan produk-produk pangan fungsional yang berupaya mengoptimalkan keseimbangan mikroflora tubuh. Beberapa jenis gula mampu meningkatkan pertumbuhan mikroflora dalam saluran pencernaan, seperti tercantum dalam **Tabel 1**.

Tabel 1. Oligosakarida, disakarida, dan poliol yang dapat meningkatkan Bifidobakteria dan bakteri asam laktat dalam saluran pencernaan

Jenis Gula	Bakteri yang Meningkat
Fruktooligosakarida	Bifidobakteria
Transgalaktosil Oligosakarida	Bifidobakteria
4- Galaktosil Laktosa	Bifidobakteria
Isomalttooligosakarida	Bifidobakteria
Galaktooligosakarida(oligomat 50)	Bifidobakteria
Galaktosil Oligosakarida	Bifidobakteria
Oligosakarida Kedelai	Bifidobakteria dan beberapa laktobasili
Xilooligosakarida	Bifidobakteria
Palatinose	Bifidobakteria
Silitol	Bakteri Asam Laktat
Laktulosa	Bifidobakteria dan Bakteri Asam Laktat
Inulofruktosakarida	Bifidobakteria

Hasil-hasil penelitian mutakhir yang berkaitan dengan metabolisme bakteri bermanfaat Bifidobakteria menunjukkan kemampuan bakteri ini memanfaatkan oligosakarida. Pemanfaatan lain oligosakarida adalah dalam pengembangan produk-produk pangan fungsional pembawa bakteri-bakteri hidup Bifidobakteria. Sebagai upaya mempertahankan jumlah dan viabilitas bakteri-bakteri tersebut dalam produk pangan fermentasi diperlukan substrat dengan kandungan gula yang tidak dapat diserap/terserap lambat, antara lain oligosakarida.

Salah satu jenis oligosakarida yang telah digunakan untuk meningkatkan jumlah bifidobakteria dalam saluran pencernaan adalah galaktooligosakarida. Galaktooligosakarida terdapat dalam susu ibu dan susu sapi. Konsumsi sebanyak 10 gr/hari diperlukan untuk meningkatkan jumlah bifidobakteria dan laktobasili. Galaktooligosakarida juga dapat diperoleh dengan cara sintesa menggunakan enzim β -Galaktosidase yang memecah laktosa ataupun galaktosa sebagai substratnya.

Galakto-oligosakarida (GalOS) ini sering juga disebut oligosakarida tak tercerna (*non-digestible* oligosakarida) yang tidak diserap/dicerna dalam usus halus manusia, sehingga langsung masuk ke dalam usus besar. Dalam usus besar, GalOS akan difermentasi oleh mikroba yang ada sehingga akan terjadi peningkatan jumlah mikroba yang menguntungkan (*Bifidobacterium sp*), serta mampu menekan jumlah mikroba yang berbahaya.

GalOS adalah faktor pertumbuhan yang efisien untuk *Bifidobacteria* dan juga mempunyai efek positif dalam peningkatan jumlah *Lactobacillus* diantara mikroba yang lain di usus. *Bifidobacteria* mampu memproduksi vitamin dan berperan serta dalam pencernaan manusia dengan cara memperbaiki metabolisme protein dan mencegah pertumbuhan bakteri pembusuk. *Bifidobacteria* juga memiliki sifat antikarsinogenik dan antikolesterolamik.

Komponen aktif dalam bahan pangan yang menimbulkan adanya sifat fungsional telah mendapat perhatian yang cukup tinggi, terlihat dari

banyaknya laporan tentang manfaat suatu komponen yang dijumpai dalam suatu bahan pangan, baik yang berasal dari pangan nabati maupun hewani (Muchtadi dan Wijaya, 1996).

Hal ini juga terjadi pada GalOS, dimana lebih dari 130 GalOS telah diidentifikasi ada dalam air susu ibu (ASI). Bayi bukan pengkonsumsi ASI tidak bisa mendapatkan kompleks GalOS ini dari makanan sehari-hari atau susu sapi karena perbedaan komposisi dan karakteristik dari ASI. Penambahan GalOS sintesis ke dalam makanan bayi mungkin akan dapat memperbaiki sistem imunitas dan ketahanan tubuh bayi non penyusu. Oleh karena itu bayi yang menyusu ASI akan memiliki imunitas dan sistem pertahanan tubuh yang lebih baik daripada yang tidak menyusu (Zarate, 1990).

Produksi GalOS analog dengan GalOS ASI merupakan langkah yang efektif daripada mengekstraknya langsung dari ASI itu sendiri, karena ASI tidak akan dapat dibeli secara komersial dan juga akan sulit mengumpulkannya dari para ibu yang menyusui. GalOS dapat disintesa baik secara kimia maupun secara enzimatis. Metode sintesa secara enzimatis lebih sederhana karena hanya membutuhkan enzim β -Galaktosidase, galaktosa, laktosa, gula aseptor, dan air untuk memulai reaksinya.

1.2 Permasalahan

Galaktooligosakarida dapat disintesis secara enzimatis menggunakan enzim β -galaktosidase asal *Bacillus circulans* dengan memecah substrat laktosa atau galaktosa. Namun masih belum diketahui beberapa hal, yaitu :

1. Konsentrasi gula yang maksimal dalam memproduksi Galaktooligosakarida.
2. Kondisi pH yang paling baik untuk aktivitas enzim β -Galaktosidase dalam mensintesis galaktooligosakarida.

3. Lama inkubasi yang tepat untuk mensintesis galaktooligosakarida yang paling maksimal.

1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui konsentrasi total gula yang optimum dalam memproduksi galaktooligosakarida.
2. Mengetahui pH yang paling baik untuk aktivitas enzim β -Galaktosidase dalam mensintesa galaktooligosakarida yang paling maksimal.
3. Mengetahui waktu inkubasi yang tepat untuk produktivitas GalOS paling maksimal.

1.4 Kegunaan Penelitian

Adapun kegunaan dari penelitian ini adalah:

1. Meningkatkan pemanfaatan oligosakarida dalam rangka pengembangan produk-produk pangan fungsional.
2. Memberikan informasi tentang sintesa Galaktooligosakarida secara enzimatik menggunakan enzim β -Galaktosidase yang berasal dari *Bacillus circulans*.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Makanan Fungsional

Dewasa ini, secara internasional terdapat peningkatan fokus pada potensi kesehatan pangan, terutama perhatian pada makanan/minuman yang tidak hanya untuk mensuplai nutrien, tetapi lebih jauh lagi yaitu untuk menghilangkan suatu pengaruh terhadap fungsi atau proses fisiologis sistematis. Telah diketahui terdapat potensi kesehatan pada pangan lebih daripada yang sudah biasa didefinisikan, dan hal ini telah menarik perhatian berbagai golongan termasuk konsumen, industri, pemerintah, ahli kesehatan, dan peneliti biomedis (Muchtadi dan Wijaya, 1996).

Di Amerika Serikat, Food and Drug Assosiation (FDA) mendefinisikan makanan atau minuman sebagai produk yang terutama dikonsumsi karena rasanya, aromanya, ataupun nilai gizinya. Akan tetapi pada sepuluh tahun terakhir ini muncul paradigma baru dalam ilmu pangan dan gizi, yaitu apa yang disebut sebagai *functional food*.

Meskipun semua makanan/minuman mempunyai fungsi yang berkaitan dengan aroma, rasa/ nutrien esensial, pangan fungsional adalah yang mengandung komponen aktif secara fisiologis, dan digunakan untuk pencegahan/penyembuhan suatu penyakit, atau untuk mencapai kesehatan tubuh yang optimal (Muchtadi dan Wijaya, 1996).

Istilah pangan fungsional selanjutnya digunakan secara luas untuk mengidentifikasi dan mendefinisikan makanan yang mempunyai kemampuan untuk mempengaruhi proses fisiologis, sehingga meningkatkan potensi kesehatan dari makanan tersebut (Muchtadi dan Wijaya, 1996).

Dari semua uraian tersebut, maka secara umum pangan fungsional didefinisikan sebagai pangan yang selain bergizi juga mempunyai pengaruh positif terhadap kesehatan. Di dalam pangan tersebut terkandung komponen/zat-zat tertentu yang mempunyai aktivitas fisiologis yang memberikan efek positif bagi kesehatan tubuh. Para ilmuwan Jepang

menekankan pada 3 faktor yang harus dipenuhi oleh suatu produk agar dapat dikategorikan sebagai pangan fungsional, yaitu :

1. Produk tersebut harus merupakan suatu produk pangan (bukan kapsul, tablet, atau serbuk) yang berasal dari bahan alami.
2. Produk tersebut dapat dan selayaknya dikonsumsi sebagai bagian dari pangan sehari-hari.
3. Produk tersebut mempunyai fungsi tertentu pada waktu dicerna dan berperan tertentu dalam proses metabolisme di dalam tubuh, misalnya: (a) memperkuat mekanisme pertahanan tubuh, (b) mencegah timbulnya penyakit tertentu, (c) membantu untuk mengembalikan kondisi tubuh setelah terserang penyakit tertentu, (d) menjaga kondisi fisik dan mental, dan (e) memperlambat proses penuaan.

Makanan /minuman fungsional adalah makanan yang dibuat berdasarkan pengetahuan tentang hubungan antara komponen makanan dan kesehatan yang diharapkan memberikan manfaat bagi kesehatan. Meskipun diharapkan memberikan manfaat bagi kesehatan, makanan fungsional tidak dianggap sebagai obat, melainkan dikategorikan tetap sebagai makanan. Karena dikategorikan sebagai makanan itulah, maka makanan fungsional harus memberikan fungsi-fungsi gizi dan sensori. Dengan demikian makanan fungsional pada dasarnya seharusnya memberikan fungsi-fungsi (1) gizi, (2) sensori, dan (3) fisiologik.

2.2 Prebiotik dan Probiotik

2.2.1 Prebiotik

Prebiotik merupakan produk alami yang berasal dari zat pati tanaman. Kendati di Indonesia tergolong baru, sebenarnya prebiotik sudah lama ditemukan. Yang pertama kali mengembangkannya adalah Hidaka, peneliti Jepang, pada 1983. Prebiotik bisa dijumpai dalam berbagai tanaman seperti pisang, asparagus, bawang putih, bawang

bombay, tomat, sereal (gandum dan biji-bijian), susu sapi, yoghurt, dan madu (Kurniasih, 2001).

Bahan prebiotik yang kita makan harus tak bisa diserap ketika melewati usus kecil atau harus tetap utuh, hingga di usus besar dapat digunakan untuk menumbuhkembangkan bakteri yang menguntungkan yang ada didalamnya. Dengan makin banyaknya bakteri yang menguntungkan di usus besar, berarti daya tahan tubuhpun jadi lebih baik. Sebab bakteri ini, akan menghasilkan asam laktat hingga menambah tingkat keasaman dalam usus. Tingkat keasaman yang tinggi akan membuat bakteri merugikan yang menyebabkan diare, kolera, disentri, dan penyakit perut lainnya, tak tahan dan banyak yang mati (Kurniasih, 2001).

Selain menumbuhkan probiotik atau bakteri bermanfaat dalam usus, produk makanan yang mengandung prebiotik juga berguna untuk membunuh kuman-kuman yang tak perlu, memiliki penangkal atau penetralisir efek samping antibiotik, dan mencegah infeksi, sehingga sangat membantu fungsi pencernaan (Kurniasih, 2001).

Sumber karbon dan energi bakteri dalam usus besar berasal dari karbohidrat yang tidak tercerna dalam usus halus seperti oligosakarida. Akibat masuk oligosakarida, jumlah bifidobakteria justru berlipat ganda, sehingga oligosakarida berpotensi untuk dimanfaatkan dalam pengembangan produk-produk pangan fungsional yang berupaya mengoptimasi keseimbangan mikroflora tubuh (Nuraida, 1996).

Konsep paling baru yang menguntungkan dan sekarang tengah dimantapkan di Eropa, adalah prebiotik yang didefinisikan sebagai bahan pangan yang tidak dapat dicerna dan bermanfaat dalam menstimulasi pertumbuhan dan aktivitas sejumlah bakteri dalam kolon secara selektif, serta dapat memperbaiki kesehatan tubuh (Broste, 1997)

Prebiotik, bahan suplemen yang terbentuk dari mikroorganisme-mikroorganisme yang menguntungkan, bisa menghasilkan kembali bakteri yang bermanfaat lainnya. Prebiotik-prebiotik tersebut mengkonversi atau

mengubah kolesterol menjadi sebuah bentuk yang memiliki tingkat penyerapan yang rendah, karena prebiotik-prebiotik tersebut bisa menghambat penyerapan kolesterol dalam jalur intestinal, dengan cara menurunkan tingkat serum kolesterol. Dalam hal ini muncul indikasi bahwa prebiotik bisa mengurangi atau menghambat timbulnya racun dan senyawa-senyawa penyebab penyakit yang ada di dalam jalur intestinal (Cichoke, 2000).

2.2.2 Probiotik

Sebuah cara untuk memastikan apakah seseorang itu sehat atau tidak mengalami gangguan pencernaan adalah menjaga tubuh secara alami dengan bantuan mikroorganisme. Miliaran bakteri yang hidup dalam jalur gastrointestinal, ada yang sangat bermanfaat ada pula yang dapat menyebabkan gangguan pencernaan (Cichoke, 2000).

Tubuh kita bergantung pada kemampuan bakteri-bakteri untuk bisa membentuk vitamin B termasuk juga biotin, niacin, asam folic, dan pyridoxin. Selain menghasilkan enzim laktase yang bermanfaat untuk mencerna gula susu (laktosa), mikroorganisme-mikroorganisme ini juga menghasilkan substansi-substansi bakteri yang bisa membunuh atau mendesak keberadaan bakteri penyebab penyakit dalam saluran pencernaan (Cichoke, 2000).

Dua jenis bakteri bermanfaat yang paling dominan dalam tubuh manusia adalah bakteri *acidophilus* (ditemukan di dalam usus halus dan usus besar serta dapat menghambat beberapa bakteri yang dapat membusukkan vitamin B1) serta *bifidobacterium* (terutama ditemukan di usus besar dan menghasilkan asam laktat dan asetat serta vitamin-vitamin B) (Cichoke, 2000).

Menjaga rendahnya pH dalam usus merupakan kunci utama untuk mendukung aktivitas bakteri-bakteri ini dan cara ini juga sangat bermanfaat untuk menangkis organisme-organisme yang berbahaya

karena sebagian besar dari bakteri-bakteri ini tidak dapat bertahan hidup dalam lingkungan asam (Kurniasih, 2001).

Bakteri yang bermanfaat juga sering disebut probiotik. Probiotik yang biasa digunakan adalah *lactobacilli* dan *bifidobakteria*, karena kedua jenis bakteri ini tahan atau tetap hidup dalam tingkat keasaman di usus, sehingga dia tumbuh dan mengeluarkan bahan-bahan yang mendukung kesehatan (Kurniasih, 2001).

Bifidobakteria yang sehat yang ada didalam saluran usus ternyata bisa menghasilkan enzim yang sangat penting untuk memutus rangkaian fruktooligosakarida dan ia bisa memakai enzim tersebut sebagai sumber makanan. *Bifidobakteria* dan *Lactobacilli* merupakan bakteri-bakteri fermentasi yang keberadaannya di dalam saluran pencernaan mampu memberi sumbangan bagi kesempurnaan proses fisiologis tubuh (Cichoke, 2000).

Upaya-upaya yang dapat dilakukan untuk mempertahankan dominansi bakteri-bakteri bermanfaat antara lain adalah dengan mengendalikan sumber-sumber gula yang bermanfaat bagi metabolisme bakteri-bakteri tersebut atau secara langsung memberi masukan bakteri hidup (Nuraida, 1996).

Orang-orang yang menambahkan probiotik serta prebiotik pada masa diet mereka, dapat menaikkan gas dalam usus, kram perut dan pembengkakan. Hal ini menjadi sebuah indikasi bahwa bakteri menguntungkan sedang mengalami proses fermentasi dan merubah usus menjadi tempat yang sangat berasam, sehingga hal ini akan menyingkirkan bakteri-bakteri yang merugikan. Pada saat yang bersamaan, tubuh akan mengalami penyesuaian dan efek-efek sampingannyapun akan lenyap. Sisi positifnya adalah bahwa gas dan pembengkakan tersebut menjadi pertanda nyata bahwa probiotik dan prebiotik sedang bekerja (Cichoke, 2000),

2.3 Oligosakarida dan Galaktooligosakarida

2.3.1 Oligosakarida

Bersama-sama dengan lemak dan protein, karbohidrat memegang peranan dasar bagi kehidupan di bumi ini. Bukan saja sebagai sumber energi utama bagi makhluk hidup, tetapi juga sebagai senyawa yang menyimpan energi kimia. Karbohidrat berasal dari pengertian atom karbon yang terhidrasi dengan rumus $(\text{CH}_2\text{O})_n$. Karbohidrat tersusun sebagai polihidroksi aldehida atau polihidroksi keton atau zat yang jika dihidrolisis menghasilkan salah satu senyawa tersebut. Karbohidrat dapat dibagi dalam tiga kelompok, yaitu: kelompok pertama monosakarida ; kelompok kedua oligosakarida ; dan kelompok ketiga polisakarida (Girindra, 1993).

Oligosakarida adalah polimer dengan derajat polimerisasi 2 sampai 10 dan biasanya bersifat larut dalam air. Oligosakarida yang terdiri dari dua molekul disebut disakarida, dan bila tiga molekul disebut triosa ; bila sukrosa terdiri dari molekul glukosa dan fruktosa, laktosa terdiri dari molekul glukosa dan galaktosa (Winarno, 1997). Oligosakarida dapat juga diklasifikasikan menjadi homo-oligosakarida yang terdiri dari satu tipe monosakarida dan hetero-oligosakarida yang terdiri dari dua atau lebih tipe monosakarida penyusunnya (El Khadem, 1988).

Disakarida terbentuk dengan menggabungkan dua molekul molekul monosakarida. Disakarida yang paling banyak dalam makanan adalah sukrosa, laktosa, dan maltosa. Laktosa hanya terdapat dalam susu atau diproduksi dari susu, karenanya biasa disebut gula susu. Laktosa terdiri dari D-galaktosa dan D-glukosa yang berikatan melalui ikatan β (1,4)-glikosida. Laktosa bersifat tidak larut dan lambat tercerna. Laktosa tidak cepat berpindah dari usus, sehingga bakteri-bakteri tertentu pembentuk asam organik lebih efisien dalam mengkonsumsinya. Asam-asam tersebut membantu pertumbuhan bakteri-bakteri menguntungkan dan dapat meningkatkan kelarutan, karenanya kalsium dapat terserap baik (Stefferd, 1959).

Galaktosa merupakan jenis heksosa yang sangat penting dalam ilmu pangan, karena dia merupakan satu diantara dua molekul yang membentuk laktosa (gula susu). Galaktosa diproduksi dalam yoghurt dengan adanya aktivitas bakteri dalam proses fermentasi (Bennion, 1980).

Glukosa dan galaktosa adalah produk utama dari hidrolisis laktosa. Monosakarida ini lebih mudah difermentasi, lebih cepat larut, dan lebih manis dari laktosa. Perbedaan lainnya yang diteliti, jika dilihat dari sudut pandang pemrosesannya adalah adanya reaktivitas yang tinggi dari monosakarida-monosakarida ini bila dibandingkan dengan laktosa. Akibatnya, warna, rasa dan aromanya bisa saja mengalami kerusakan selama proses pemanasan karena adanya reaksi karamelisasi dan pencoklatan (Winarno, 1997).

Senyawa oligosakarida dapat diekstraksi dari air susu ibu, feses bayi, tanaman, dan tumbuh-tumbuhan (Bucke dan Rastall, 1990). Oligosakarida juga dapat dihasilkan dengan memecah polisakarida sel mikroorganisme. Namun demikian jumlah oligosakarida yang didapat sangat kecil. Teknik yang sedang populer saat ini adalah melalui sintesa oligosakarida secara enzimatis dengan menerapkan reaksi hidrolisa terbalik (*reversed hydrolisis*).

2.3.2 Galaktooligosakarida

Galaktooligosakarida terdapat dalam susu ibu dan susu sapi. Konsumsi sebanyak 10 g/hari diperlukan untuk meningkatkan jumlah *bofidobakteria* dan *laktobasilli* . Dengan adanya galaktooligosakarida yang terkandung dalam susu ibu, maka air susu ibu memiliki lebih banyak komponen pengkebal / pelindung dan sistem pertahanan daripada lainnya (Muchtadi dan Wijaya, 1996).

Galaktooligosakarida termasuk pada jenis oligosakarida yang tidak bisa dicerna didalam usus kecil manusia atau hewan. Oligosakarida ini tidak akan berubah saat beraca dalam usus besar, sehingga telah siap difermentasi oleh mikroflora dalam usus. Hal ini akan menyebabkan

beberapa perubahan mikroflora dan dengan demikian jumlah mikroorganisme menguntungkan akan meningkat dan di lain pihak hal ini akan menurunkan populasi bakteri-bakteri yang merugikan. Perubahan-perubahan yang mungkin saja terjadi di dalam flora akan sangat bermanfaat bagi kesehatan manusia (Nuraida, 1996).

Oligosakarida yang tidak dapat dicerna terdapat dalam tanaman-tanaman yang bisa dimakan atau sebagaimana juga terdapat pada susu ibu dan madu. Beberapa kelompok oligosakarida yang tidak dapat dicerna ini adalah fructooligosakarida, galactooligosakarida, dan glucooligosakarida. Oligosakarida juga bisa diproduksi secara komersial dan dipakai sebagai makanan fungsional atau prebiotik (Bach-Knudsen, 2000).

Penerapan galactooligosakarida kedalam makanan merupakan suatu hal yang sangat menarik. Penelitian untuk produksi GalOS dengan menggunakan β -galaktosidase dari mikroba semakin menarik pada dekade terakhir ini. Hidrolisa laktosa berlangsung pada konsentrasi laktosa rendah, selanjutnya produksi oligosakarida dengan reaksi transgalaktosida akan berlangsung juga dengan meningkatnya konsentrasi laktosa.

Hidrolisa laktosa dan sintesa GalOS terjadi secara simultan yang membuat mekanisme reaksi sangat kompleks. Konversi laktosa menjadi GalOS akan meningkat dengan meningkatnya konsentrasi laktosa dalam media, karena grup β -galaktosil mempunyai peluang tinggi untuk melekat kepada laktosa dan/atau oligosakarida daripada ke air sebagai aseptor (Iwasaki et al., 1996).

2.4 Reaksi Sintesa Oligosakarida oleh Enzim β -Galaktosidase

Enzim dikatakan sebagai suatu kelompok protein yang berperan sangat penting dalam proses aktivitas biologis. Enzim ini berfungsi sebagai katalisator dalam sel dan sifatnya sangat khas. Dalam jumlah yang sangat kecil, enzim dapat mengatur reaksi tertentu sehingga dalam

keadaan normal tidak terjadi penyimpangan-penyimpangan hasil akhir reaksinya. Enzim ini akan kehilangan aktivitasnya akibat panas, asam atau basa kuat, pelarut organik, atau apa saja yang bisa menyebabkan denaturasi protein. Enzim dikatakan mempunyai sifat sangat khas, karena hanya bekerja pada substrat tertentu dan bentuk reaksi tertentu (Girindra, 1993).

Menurut Montgomery (1993), enzim dikelompokkan menjadi 6 kelas, yaitu :

1. Oksidoreduktase, enzim yang mengkatalisis berbagai macam reaksi oksidasi-reduksi;
2. Transferase, yang mengkatalisis reaksi pemindahan berbagai gugus, seperti amino, karboksil, metil, dan lainnya;
3. Hidrolase, yang mengkatalisis pemutusan ikatan antara karbon dengan berbagai atom lain sambil mengikat molekul air;
4. Liase, yang mengkatalisis pemecahan ikatan antara karbon dengan karbon, karbon dengan belerang, serta beberapa jenis ikatan antara karbon dengan nitrogen (tidak termasuk ikatan peptida);
5. Isomerase, kelompok enzim yang mengkatalisis reaksi rasemisasi isomer optik atau geometrik dan reaksi-reaksi oksidasi-reduksi intra-molekuler tertentu;
6. Ligase, yang mengkatalisis pembentukan ikatan antara karbon dengan oksigen, belerang, nitrogen, dan atom-atom lain .

Laktase (β -galaktosidase, EC 3.2.1.23) merupakan enzim yang digunakan untuk memecah laktosa yang terkandung dalam air susu. Laktosa ini umumnya tidak diminati karena tingkat kemanisannya rendah, dan kelarutannya rendah sehingga dapat menimbulkan gangguan kesehatan yang biasa dikenal dengan *lactosa intolerance*. Enzim laktase ini dapat memutus ikatan β -galaktosidic antara dua molekul monosakarida yang membentuk laktosa, yaitu glukosa dan galaktosa (Eskin, 1990).

Pada konsentrasi laktosa yang tinggi enzim ini akan mengkatalisis reaksi pemindahan yang akan membentuk tri dan tetrasakarida dari

laktosa. Titik perhatiannya adalah enzim ini akan memproduksi bahan dari produk oligosakarida yang telah siap terhidrolisa oleh enzim dalam usus. Gambaran dari reaksi ini adalah banyak gula-gula yang dapat digunakan sebagai akseptor, menawarkan potensinya untuk membuat suatu oligosakarida yang menarik dan dapat dipatenkan. Oligosakarida ini dapat disintesis dengan cara teknik kimia atau cara enzimatik. Teknik enzimatik lebih sederhana, karena hanya membutuhkan enzim (β -galaktosidase), galactosa, lactosa, dan air untuk memulai reaksinya (Iwasaki et al., 1996).

Enzim β -galaktosidase dari berbagai sumber telah digunakan untuk sintesa galaktooligosakarida seperti dari *Bacillus circulans*. Adapun problem paling berarti dari β -galaktosidase adalah dia cenderung kearah *regioselective* rendah dan terbentuknya ikatan glikosidik (Suwasono dan Rastall, 1996).

Penggunaan enzim sebagai katalis untuk sintesa komponen organik telah dikembangkan beberapa tahun ini. Aplikasi teknik ini telah digunakan untuk sintesa oligosakarida menggunakan glikosil transferase (E.C.2.4) atau glikosidase (E.C.3.2) (Monsan dan Paul, 1995). Sintesa Oligosakarida dapat dilakukan dengan metode reaksi kesetimbangan (ekuilibrium) dan reaksi kinetika (Monsan dan Paul, 1995).

Reaksi sintesa ekuilibrium, hanya membutuhkan sebuah enzim dan monosakarida. Enzim akan mengkatalisa ikatan langsung dari unit-unit monosakarida untuk membentuk oligosakarida. Reaksi ini dikenal sebagai glikosilasi langsung (*direct glycosylation*) atau hidrolisa terbalik (*reverse hydrolysis*).

Konsentrasi monosakarida yang tinggi dapat memacu reaksi sintesa oligosakarida. Sintesa oligosakarida mudah dicapai dengan menurunkan aktivitas air melalui peningkatan konsentrasi monosakarida (Rastall et al. 1991, Rastall et al.1992b; Suwasono dan Rastall, 1996). Suhu reaksi yang digunakan ada ah 50-60°C, dan enzim akan tetap stabil karena konsentrasi gula yang tinggi mampu menjaga kestabilan enzim terhadap denaturasi (Nakano et al., 1995).

Sintesa hetero-oligosakarida akan berjalan jika tersedia satu substrat sebagai donor dan gula yang lain sebagai aseptor, dan sintesa ini akan dipacu dengan rasio donor:aseptor sekitar 15%:85% (Rastall *et al.*, 1991). Pembentukan heteromannooligosakarida telah dilakukan dengan enzim α -mannosidase pada rasio donor 50% : aseptor 50% dengan total gula 70% (g/g) (Suwasono dan Rastall, 1998). Pembentukan hetero-oligosakarida dapat terjadi secara bersama-sama dengan pembentukan homo-oligosakarida (Rastall *et al.*, 1991; Rastall *et al.*, 1992a; Suwasono dan Rastall, 1998).

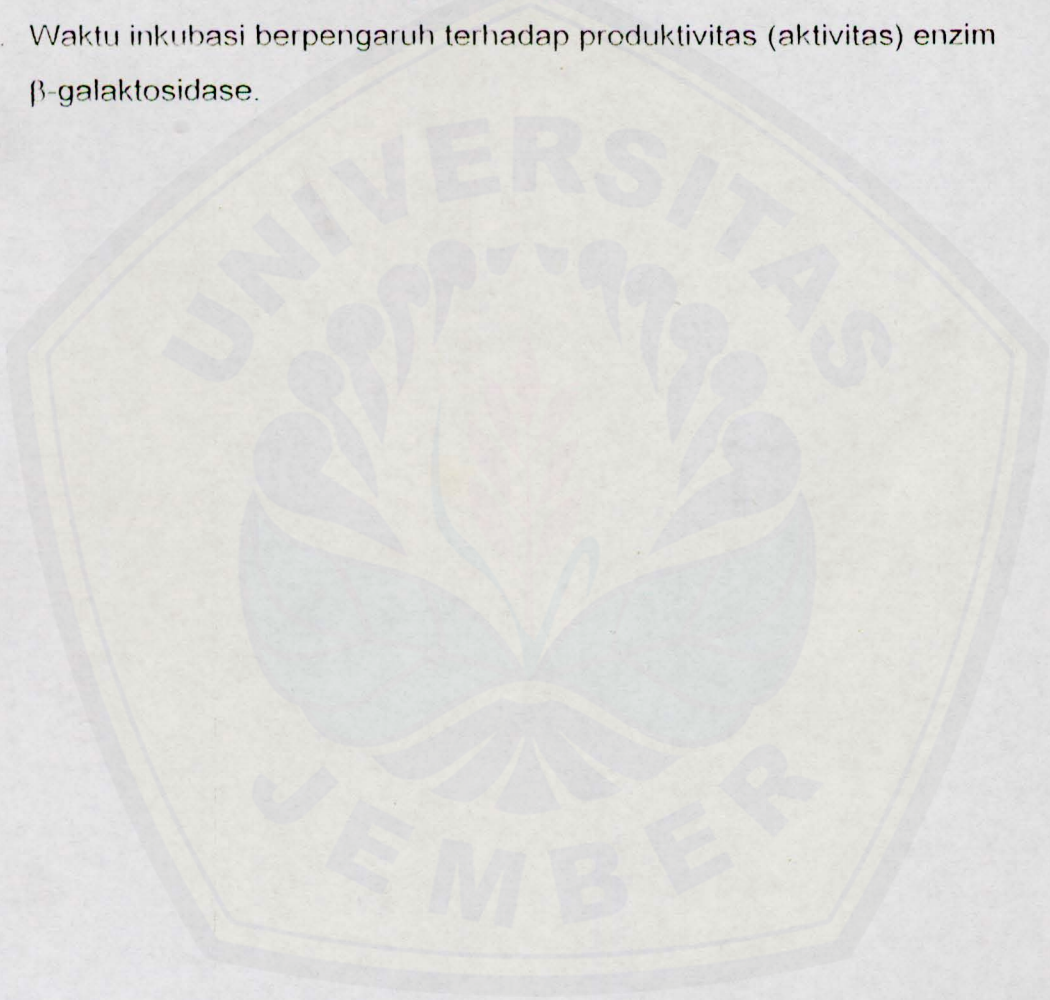
Reaksi sintesa enzimatik yang dilakukan oleh enzim β -galaktosidase menghasilkan sejumlah variabel penting dan beberapa tipe oligosakarida selama masa hidrolisis laktosa. Semua ini tergantung pada banyak faktor, namun beberapa faktor yang penting adalah sebagai berikut :

(1). Sumber enzim, (2). Sifat dan konsentrasi substrat, (3). Tipe pemrosesan enzim, (4). Garam, temperatur, dan pH, serta (5). Tingkat konversi laktosa (Zarate dan Lopez-Leiva, 1990). Namun, kajian awal yang dilakukan terhadap penggunaan enzim β -galaktosidase, menunjukkan bahwa dengan konsentrasi substrat dan temperatur yang tinggi, maka akan dapat menurunkan aktivitas air dan menaikkan daya larut substrat. Dengan demikian maka akan dapat meningkatkan produk galaktooligosakarida yang dihasilkan (Larsson *et al.*, 1972).

Aktivitas dari β -galaktosidase yang berasal dari *Bacillus circulans* banyak dipengaruhi oleh banyak faktor. Aktivitas β -galaktosidase menghasilkan banyak galaktooligosakarida termasuk di-, tri-, tetra-, dan pentasakarida. Sewaktu 60% laktosa dikonversi, 41% dari total sakarida adalah oligosakarida. β -galaktosidase yang berasal dari *Bacillus circulans* menghasilkan jumlah tri- dan tetrasakarida yang sangat besar daripada menggunakan enzim-enzim lainnya (11-47%) (Zarate dan Lopez-Leiva, 1990).

2.5 Hipotesis

1. Konsentrasi dan jenis substrat (laktosa dan galaktosa) berpengaruh terhadap aktivitas enzim β -galaktosidase dalam mensintesa galaktooligosakarida.
2. pH Larutan substrat berpengaruh terhadap aktivitas enzim dalam melakukan reaksi sintesa galaktooligosakarida.
3. Waktu inkubasi berpengaruh terhadap produktivitas (aktivitas) enzim β -galaktosidase.



III. BAHAN DAN METODE PENELITIAN

3.1 Bahan dan Alat Penelitian

3.1.1 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

- (1). *aquadest* dan *bidest*, (2). asam asetat 0,1M, (3). NaOH 0,01M,
- (4). larutan buffer Na-asetat pH 6,0 dan pH 7,0, (5). biogel P-2 (*polyacrylamide*), (6). enzim β -galaktosidase asal *Bacillus circulans*,
- (7). gula laktosa; galaktosa glukosa; mannososa; maltosa; dan sukrosa

3.1.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

- (1). pH-meter, (2). alat timbang, (3). *spatula*, (4). labu ukur (500 ml),
- (5). gelas ukur (1000 ml), (6). pipet gelas (10 ml), (7). *beaker glass*,
- (8). tabung *ependorf*, (9). pipet mikro dan pipet volum, (10). oven,
- (11). *refrigerator*, (12). HPLC (*High Pressure Liquid Chromatography*), yang dilengkapi *Refractive Index Detector* (RID), (13). LPLC (*Low Pressure Liquid Chromatography*), (14). *freeze dryer*, (15). Kromatografi gas yang dilengkapi *flame ionisation detector/ gas chromatography-mass spectra* (GC-MS).

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember, dan di Laboratorium Kimia Pangan, Pusat Studi Ilmu Pangan dan Gizi-UGM, Yogyakarta. Penelitian dilaksanakan mulai bulan Oktober 2000 sampai dengan April 2001.

3.3 Metode Penelitian

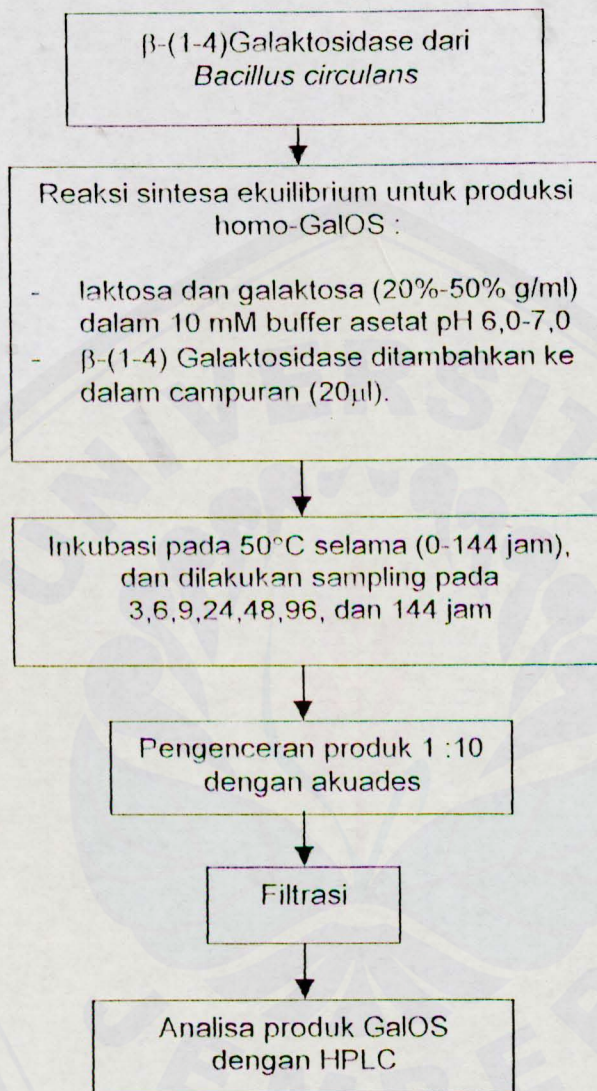
3.3.1 Sintesa Homo-GalactoOligosakarida (Homo-GalOS)

Reaksi sintesa ekuilibrium untuk homo-GalOS dilakukan pada tabung *ependorf* (total volume 1 ml) pada konsentrasi total laktosa maupun galaktosa sebagai substrat yang bervariasi (20%, 30%, 40%, dan 50% g/ml) yang dilarutkan dalam 10 mM larutan buffer Na-asetat pada pH yang bervariasi (pH 6,0 dan pH 7,0). Jadi dalam hal ini konsentrasi substrat 20% berarti, substrat sebanyak 0,2 gr dilarutkan dalam 0,8 ml buffer. Substrat 30% berarti substrat sebanyak 0,3 gr dilarutkan dalam 0,7 ml buffer, demikian seterusnya sampai volume total dalam tabung *ependorf* menjadi 1ml.

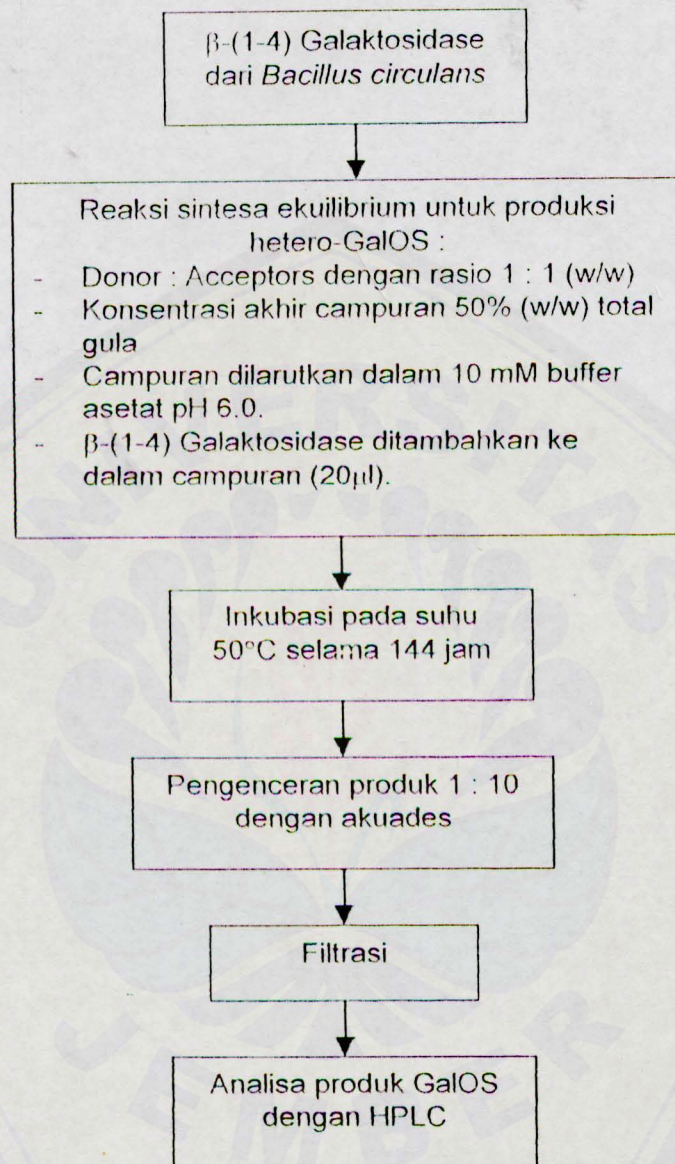
Ke dalam setiap campuran reaksi di tabung *ependorf* ditambahkan enzim β -(1-4) Galaktosidase dari *Bacillus circulans* (20 μ l), dan diinkubasi pada suhu 50 °C selama (0-144 jam). Setelah inkubasi selesai, homo-GalOS yang terbentuk dianalisa dengan HPLC. Pekerjaan ini diulang sebanyak dua kali. Diagram alir sintesa homo-GalOS secara enzimatik menggunakan enzim β -galaktosidase asal *Bacillus circulans* dapat dilihat pada **Gambar.1**

3.3.2 Sintesa Hetero-GalactoOligosakarida (Hetero-GalOS)

Sintesa hetero-GalOS dibentuk pada konsentrasi total gula 50% (g/ml) yang terdiri dari campuran galaktosa sebagai donor dan beberapa aseptor (glukosa, mannosa, maltosa, dan sukrosa) rasio 1:1 (w/w) dengan total volume akhir 1 ml. Campuran dilarutkan dalam 10 mM buffer asetat pH 6,0. Ke dalam setiap campuran reaksi, ditambahkan enzim β -(1-4)Galaktosidase dari *Bacillus circulans* (20 μ l), selanjutnya diinkubasi pada suhu 50°C selama 144 jam. Produk hetero-GalOS dianalisa menggunakan HPLC. Diagram alir sintesa hetero-GalOS secara enzimatik menggunakan enzim β -Galaktosidase asal *Bacillus circulans* dapat ditunjukkan pada **Gambar 2**.



Gambar 1. Diagram Alir Sintesa Homo-GalOS oleh enzim β-Galaktosidase asal *Bacillus circulans*



Gambar 2 . Diagram Alir Sintesa Hetero-GalOS oleh enzim β -Galaktosidase asal *Bacillus circulans*.

3.3.3 Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) secara faktorial menggunakan 2 faktor yaitu faktor

konsentrasi substrat (C) dan faktor pH larutan substrat (faktor P), serta diulang sebanyak dua kali. Faktor C terdiri atas empat level, yaitu :

C2 = 20%

C3 = 30%

C4 = 40%

C5 = 50%

Dan faktor P terdiri atas dua level, yaitu :

P6 = pH 6.0

P7 = pH 7.0.

Kombinasi yang dihasilkan dari kedua faktor perlakuan tersebut adalah : C2P6, C3P6, C4P6, C5P6, C2P7, C3P7, C4P7, C5P7. Adapun model linier yang digunakan dapat dituliskan sebagai berikut :

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}; \quad \begin{array}{l} i = 1, \dots, a \\ j = 1, \dots, b \\ k = 2, \dots, r \end{array}$$

Dimana :

Y_{ijk} = Nilai pengamatan pada satuan percobaan ke-k yang memperoleh kombinasi perlakuan ij (taraf ke-i dari faktor A dan taraf ke-j dari faktor B)

μ = Nilai tengah populasi

α_i = Pengaruh aditif taraf ke-i dari faktor A

β_j = Pengaruh aditif taraf ke-j dari faktor B

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Pengaruh interaksi taraf ke-i faktor A dan taraf ke-j faktor B

ϵ_{ijk} = Pengaruh galat dari satuan percobaan ke-k yang memperoleh kombinasi perlakuan ij

α, β, r = jumlah taraf dari faktor A, jumlah taraf dari faktor B dan jumlah ulangan.

3.4 Pengamatan

Parameter pengamatan yang dilakukan meliputi kadar, bentuk dan struktur GalOS yang dihasilkan dari reaksi sintesa enzim β -Galaktosidase asal *Bacillus circulans*. Perbandingan yang dilakukan adalah atas dasar perbedaan jenis konsentrasi dan pH substrat.

3.5 Prosedur Analisis

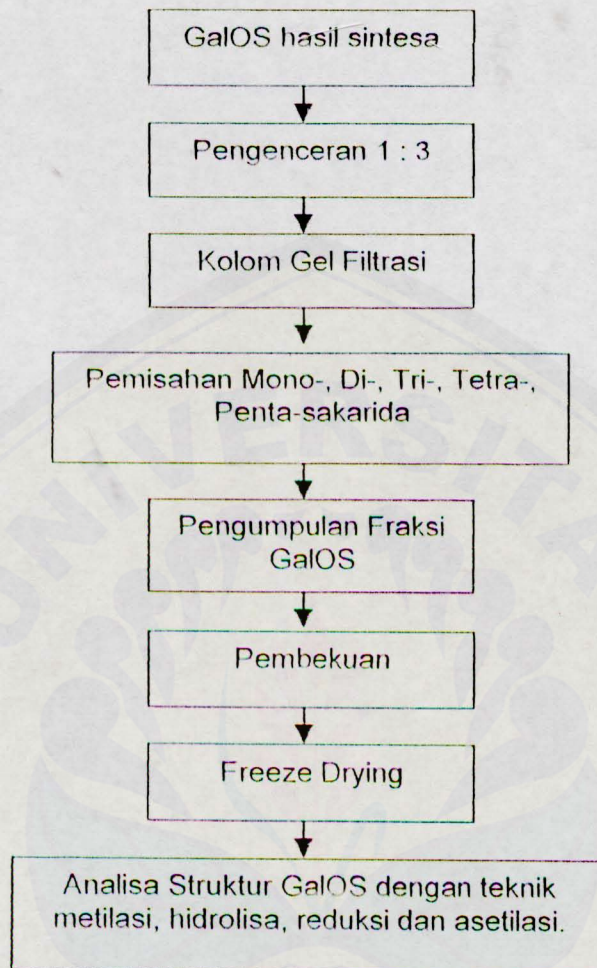
3.5.1 Analisa GalOS dengan HPLC

Produk GalOS dideteksi oleh HPLC yang dilengkapi *refractive index detector*, menggunakan kolom Aminex-HPX 87 H (300 mm x 7,8 mm) dengan eluen air pada suhu 50°C dan kecepatan 0,5 ml/menit. Konsentrasi GalOS yang terbentuk dapat dihitung dengan menggunakan kurva standar seperti pada **Lampiran 3**.

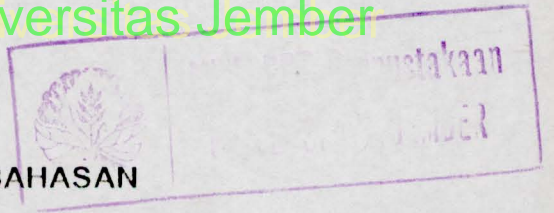
3.5.2 Analisa Struktur GalOS dengan GC-MS

Sebelum analisa struktur, GalOS harus dipisahkan antara monosakarida, disakarida, dan trisakarida dengan metode kromatografi gel dalam sebuah kolom (2,5 cm x 120 cm) yang berisi BioGel P-2, dialirkan air bebas ion dan gas pada kecepatan 0,5 ml/menit. Seluruh gula akan dideteksi dengan *refractive index detector*, lalu fraksi-fraksi monosakarida, disakarida, dan trisakarida dikumpulkan dan dikeringkan dengan *freeze dryer*.

Struktur dari produk kering di atas dianalisa melalui teknik metilasi, hidrolasi, reduksi, dan asetilasi. Senyawa akhir alditol asetat metilasi parsial (AAMP) selanjutnya dianalisa dengan kromatografi gas (*gas chromatography*) yang dilengkapi *flame ionisation detector* menggunakan kolom kapiler HP-5 (50 m x 0,32 mm) pada suhu 100-250 °C. mass spektra direkam dengan *mass selective detector*. Arus ionisasi dalam *electron impact* adalah 50 mA. Diagram alir analisa struktur GalOS dapat dilihat pada **Gambar 3**.



Gambar 3. Diagram Alir Proses Purifikasi GalOS dengan Metode LPC.



IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

Dalam pembahasan ini akan dikupas beberapa hal yang menjadi batasan ruang lingkup penelitian sintesa galaktooligosakarida oleh enzim β -Galaktosidase ini, yaitu pengaruh jenis dan konsentrasi substrat (20% - 50%), serta pengaruh pH (pH 6.0 dan 7.0), yang diamati pada periode waktu inkubasi (0, 3, 6, 9, 24, 48, 96, dan 144 jam).

4.1 Pengaruh Jenis dan Konsentrasi Substrat

Dari data hasil penelitian, menunjukkan bahwa Homo-GalOS yang dihasilkan dari substrat laktosa lebih banyak dibandingkan galaktosa. Pada saat laktosa digunakan sebagai substrat, enzim β -galaktosidase berperan cukup aktif dalam reaksi hidrolisa yang menghasilkan glukosa dan galaktosa. Selain berperan dalam reaksi hidrolisa, enzim ini juga dapat memacu terjadinya reaksi sintesa yang menghasilkan GalOS₂ dan GalOS₃.

Ada beberapa tahapan reaksi yang mungkin terjadi pada reaksi sintesa dengan menggunakan substrat laktosa. Tahapan pertama adalah sebagian laktosa (Gal-Glu) akan mengalami proses hidrolisa oleh enzim menjadi Galaktosa dan Glukosa. Tahapan berikutnya adalah, terjadinya reaksi sintesa yang sangat kompleks yang kemudian menghasilkan disakarida (GalOS₂), yaitu berupa gal-gal dan gal-glu. Sedangkan trisakarida (GalOS₃) yang mungkin dihasilkan dapat berupa gal-gal-gal dan gal-gal-glu.

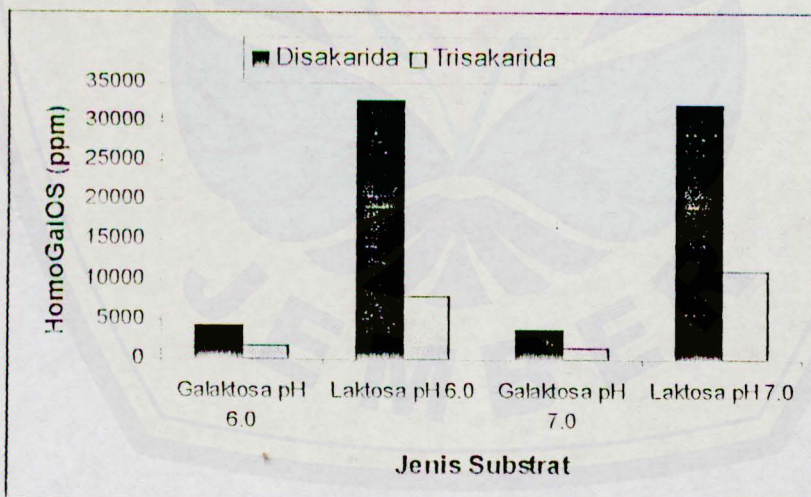
Dengan konsentrasi laktosa antara 20% sampai dengan 40%, substrat akan mengandung cukup air untuk mendukung terjadinya reaksi hidrolisa sehingga dapat memecah laktosa menjadi galaktosa dan glukosa. Untuk selanjutnya akan terjadi reaksi sintesa yang sangat kompleks.

Reaksi sintesa ini diawali dengan galaktosa yang berfungsi sebagai donor dan Gal-Glu sebagai aseptor sampai terbentuk produk disakarida

(Gal-Gal), dan trisakarida (Gal-Gal-Glu). Glukosa yang dihasilkan dari reaksi hidrolisa, akan bertindak sebagai aseptor dengan menerima kembali galaktosa menjadi Gal-Glu. Dan adanya galaktosa-galaktosa yang tersisa dari proses pemecahan laktosa masih memungkinkan untuk saling berikatan satu sama lain menjadi Gal-Gal.

Bila pada saat menggunakan substrat laktosa, reaksi sintesa melibatkan dua macam gula (galaktosa dan glukosa), tidak demikian halnya dengan substrat galaktosa. Reaksi sintesa hanya dipacu oleh substrat monosakarida untuk membentuk Gal-Gal (disakarida). Selanjutnya Gal-Gal yang terbentuk dapat menjadi donor untuk membentuk Gal-Gal-Gal (trisakarida).

Kemampuan laktosa dan galaktosa dalam menghasilkan produk disakarida dan trisakarida menunjukkan perbedaan seperti terlihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Perbedaan Kemampuan Substrat Laktosa dan Galaktosa Dalam Memproduksi Disakarida dan Trisakarida.

Pengaruh dari konsentrasi substrat dalam sintesa Homo-GalOS diamati pada konsentrasi yang bervariasi dari 20% (g/ml) sampai dengan

50% (g/ml). Untuk konsentrasi lebih dari 50%, kelarutan dari galaktosa maupun laktosa akan mengalami penurunan.

Semakin tinggi konsentrasi laktosa dan galaktosa, akan semakin meningkatkan produk Homo-GalOS. Pada kondisi konsentrasi terendah (20 %), substrat masih banyak mengandung air yang akan memacu terjadinya reaksi hidrolisa. Dalam keadaan ini akan terjadi kompetisi yang kuat antara reaksi hidrolisa dan sintesa, sehingga produk Homo-GalOS yang dihasilkan masih sedikit.

Pada konsentrasi substrat yang lebih besar (30% - 50%), akan dapat mengurangi aktivitas air, sehingga dapat memacu reaksi sintesa secara ekuilibrium. Hal ini menyebabkan Homo-GalOS yang dihasilkan semakin besar. Dalam fenomena ini terjadi keseimbangan antara reaksi sintesa dan reaksi hidrolisa, bahkan memungkinkan terjadinya reaksi sintesa yang lebih besar lagi akibat semakin berkurangnya air. Oleh karena itu produksi GalOS akan lebih cepat dan lebih banyak jika konsentrasi substrat ditingkatkan.

Pada konsentrasi substrat yang sangat tinggi (mencapai 60%), justru akan menurunkan produksi Homo-GalOS, bahkan tidak terjadi produksi sama sekali. Pada konsentrasi yang sangat tinggi akan menyebabkan aktivitas air terlalu rendah untuk memacu enzim agar dapat menjalankan aktivitasnya, dan bahkan enzim akan segera mengalami kerusakan yaitu menjadi kering (dehidrasi).

Dari keseluruhan data yang ada, proses sintesa Homo-GalOS oleh enzim β -galaktosidase asal *Bacillus circulans* memberikan hasil disakarida yang lebih banyak daripada trisakarida. Hal ini menunjukkan aktivitas enzim asal *Bacillus circulans* sangat aktif dalam reaksi sintesa, utamanya untuk produksi disakarida. Berikut akan disertakan **Tabel 2** yang berisi data beberapa perlakuan dan produksi disakarida serta trisakarida yang terbentuk.

Tabel 2. Perbandingan Besarnya Produk Disakarida dan Trisakarida pada Reaksi Sintesa oleh Enzim β -Galaktosidase asal *Bacillus circulans*.

Substrat	Perlakuan	Konsentrasi Produk Homo-GalOS (ppm)	
		Disakarida	Trisakarida
Galaktosa	P6C5	4272,6678	1627,3917
	P7C5	3658,9198	1484,5668
Laktosa	P6C5	32873,3224	8077,5271
	P7C5	19354,6645	11243,5018

4.1.1 Substrat Galaktosa

Substrat galaktosa menghasilkan homoGalOS yang cukup besar, meskipun masih lebih rendah dibanding dari substrat laktosa. Produk disakarida yang dihasilkan dari substrat galaktosa, berkisar antara 3000 (ppm) sampai dengan 4272 (ppm). Dari data hasil sidik ragam pada **Tabel 11** menunjukkan bahwa besarnya konsentrasi substrat berpengaruh sangat nyata terhadap produk disakarida yang dihasilkan.

Sedangkan data hasil uji beda Duncan untuk produk disakarida dapat dilihat pada **Tabel 3** berikut ini.

Tabel 3. Uji Beda Pengaruh Konsentrasi Substrat Galaktosa dalam Produksi Disakarida

Perlakuan	Konsentrasi Rata-rata	Rangking	Notasi
	Produk (ppm)		
C2	3232,242	1	a
C3	3489,894	2	b
C4	3517,389	3	b
C5	3965,794	4	c

Keterangan : Huruf yang sama, menunjukkan berbeda tidak nyata pada taraf nyata 0,05 Uji Duncan.

Dari **Tabel 3** tersebut, antara perlakuan C3 dan C4 memberikan hasil disakarida yang berbeda tidak nyata, meskipun untuk konsentrasi 40% (C4) produk yang dihasilkan masih lebih besar dari konsentrasi 30% (C3). Hal ini dimungkinkan karena kedua konsentrasi tersebut sama-sama berada pada kisaran konsentrasi yang berpeluang untuk terjadinya reaksi sintesa secara ekuilibrium. Sehingga dalam kedua perlakuan tersebut, reaksi sintesa yang terjadi memiliki laju yang hampir sama besar. Selain itu karena substrat yang digunakan merupakan galaktosa, maka kemungkinan terjadinya variasi reaksi sintesa lebih sedikit dibanding dengan menggunakan substrat laktosa. Dari itulah mengapa produk disakarida yang dihasilkan tidak berbeda jauh.

Produk trisakarida yang dihasilkan dari substrat galaktosa pada konsentrasi 20% - 50%, memberikan hasil berkisar antara 450 (ppm) sampai dengan 1700 (ppm). Sidik ragam produk trisakarida dari substrat galaktosa, ditunjukkan pada **Tabel 13**.

Berdasarkan **Tabel 13**, terlihat bahwa besarnya konsentrasi dari substrat (galaktosa) sangat berpengaruh terhadap besarnya produk trisakarida yang dihasilkan dari reaksi sintesa. Sedangkan dari data hasil uji beda Duncan, dapat dituliskan sebagai berikut.

Tabel 4. Uji Beda Pengaruh Konsentrasi Substrat Galaktosa dalam Produksi Trisakarida

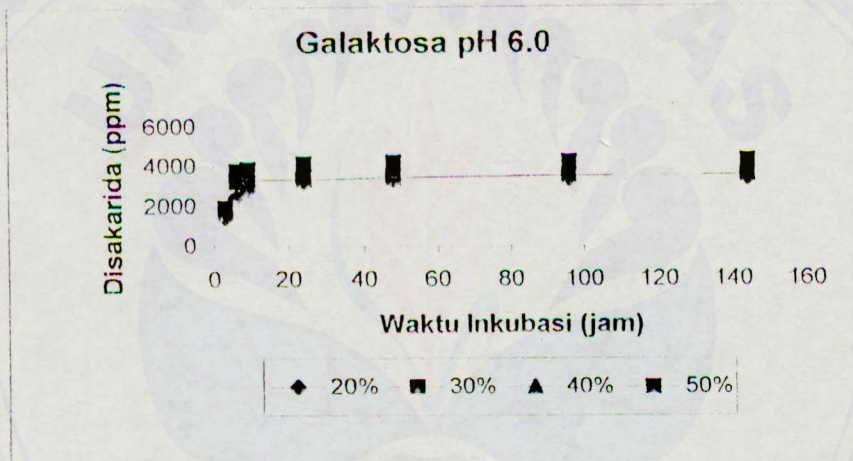
Perlakuan	Konsentrasi Rata-rata	Rangking	Notasi
	Produk (ppm)		
C2	510,514	1	a
C3	889,779	2	b
C4	1115,929	3	c
C5	1555,979	4	d

Keterangan : Huruf yang berbeda, menunjukkan berbeda nyata pada taraf nyata 0,05 Uji Duncan.

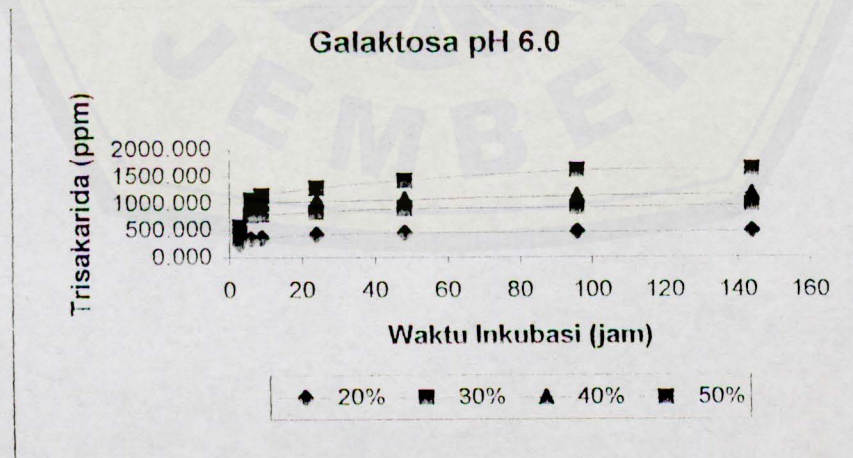
Dari **Tabel 4**, menunjukkan bahwa produksi trisakarida dari substrat galaktosa untuk berbagai perlakuan konsentrasi adalah berbeda nyata. Disini jelas bahwa dengan semakin tingginya konsentrasi substrat maka kemungkinan terhidrolisanya substrat oleh enzim semakin besar. Dengan demikian akan meningkatkan pula terjadinya reaksi sintesa dan mengakibatkan produk yang terbentuk juga semakin besar jumlahnya.

Gambar 5 menunjukkan bahwa secara umum pH dan konsentrasi substrat (galaktosa) berpengaruh secara nyata terhadap jumlah produk hasil sintesa.

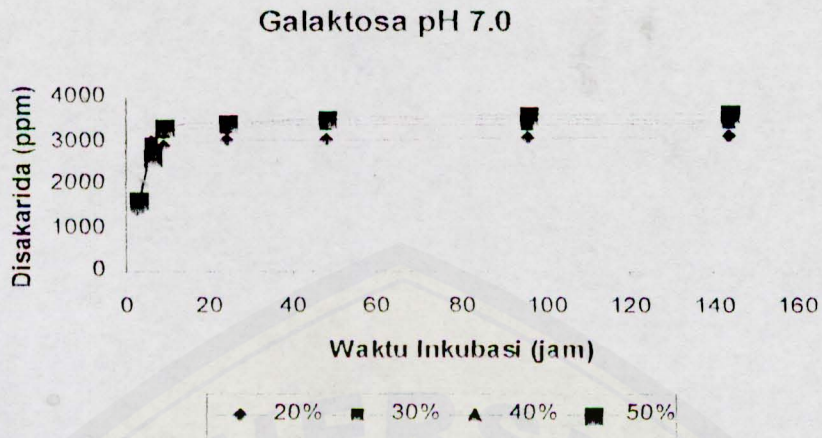
a)



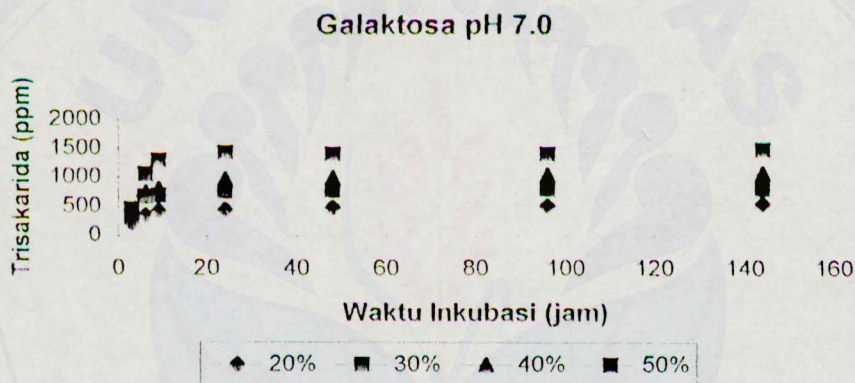
b)



c)



d)



Gambar 5. Disakarida dan Trisakarida yang Dihasilkan oleh Substrat Galaktosa pada pH 6.0 dan 7.0 dalam Waktu Inkubasi 0-144 jam.

Dari **Gambar 5**, terlihat bahwa semakin tinggi konsentrasi substrat, semakin tinggi pula produk yang dihasilkan. Sedangkan pengaruh dari waktu inkubasi adalah bahwa reaksi sintesa akan meningkat dengan semakin bertambahnya waktu inkubasi, sehingga jumlah produk yang dihasilkan semakin banyak. Hal ini berlaku baik pada pH 6.0 maupun pH 7.0.

4.1.2 Substrat Laktosa

Sama halnya dengan substrat galaktosa, adanya peningkatan konsentrasi laktosa akan dapat meningkatkan pula produksi disakarida dan trisakarida. Produk disakarida yang dihasilkan dari substrat laktosa sangat besar, yaitu berkisar 12000 (ppm) sampai dengan 33000 (ppm). Berdasarkan hasil sidik ragam produk disakarida dari substrat laktosa (**Tabel 7**) menunjukkan bahwa besarnya konsentrasi substrat memberikan pengaruh yang sangat nyata terhadap disakarida yang dihasilkan. Sedangkan dari data uji beda Duncan, semua perlakuan memberikan hasil yang berbeda nyata seperti tercantum berikut ini (**Tabel 5**).

Tabel 5. Uji Beda Pengaruh Konsentrasi Substrat Laktosa dalam Produksi Disakarida

Perlakuan	Konsentrasi Rata-rata	Rangking	Notasi
	Produk (ppm)		
C2	12854,133	1	a
C3	18305,974	2	b
C4	25415,098	3	c
C5	32565,548	4	d

Keterangan : Huruf yang berbeda, menunjukkan berbeda nyata pada taraf nyata 0,05 Uji Duncan.

Dari data konsentrasi rata-rata produk (**Tabel 5**) diatas, menunjukkan bahwa dengan semakin tingginya konsentrasi substrat maka akan semakin besar terjadinya pemecahan substrat oleh enzim, dan semakin besar pula kemungkinan terjadinya reaksi sintesa.

Tidak jauh berbeda dengan produk disakarida, dari hasil sidik ragam (**Tabel 9**) menunjukkan bahwa besarnya konsentrasi substrat juga sangat berpengaruh pada produk trisakarida yang dihasilkan dari substrat laktosa. Berdasarkan data yang ada, banyaknya trisakarida dari substrat laktosa adalah antara 2500 (ppm) sampai dengan 19000 (ppm). Pada data hasil uji beda Duncan, semua perlakuan menunjukkan hasil yang

berbeda nyata. Berikut ini **Tabel 6** yang mencantumkan data hasil uji beda Duncan.

Tabel 6. Uji Beda Pengaruh Konsentrasi Substrat Laktosa dalam Produksi Trisakarida

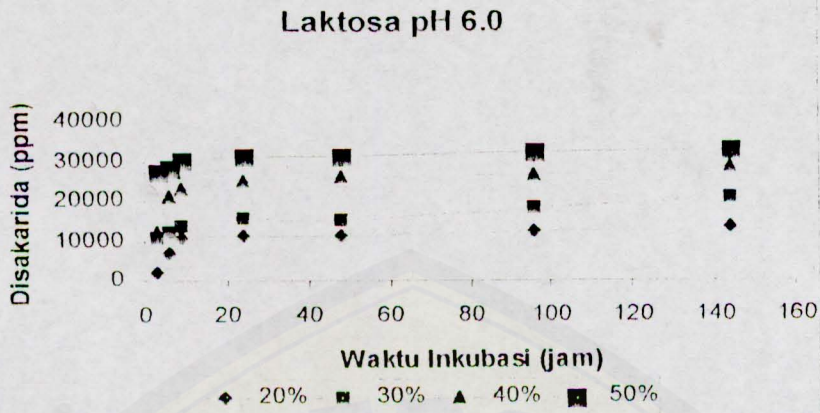
Perlakuan	Konsentrasi Rata-rata Produk (ppm)	Rangking	Notasi
C2	3524,007	1	a
C3	4773,375	2	b
C4	8804,761	3	c
C5	13408,348	4	d

Keterangan : Huruf yang berbeda, menunjukkan berbeda nyata pada taraf nyata 0,05 Uji Duncan.

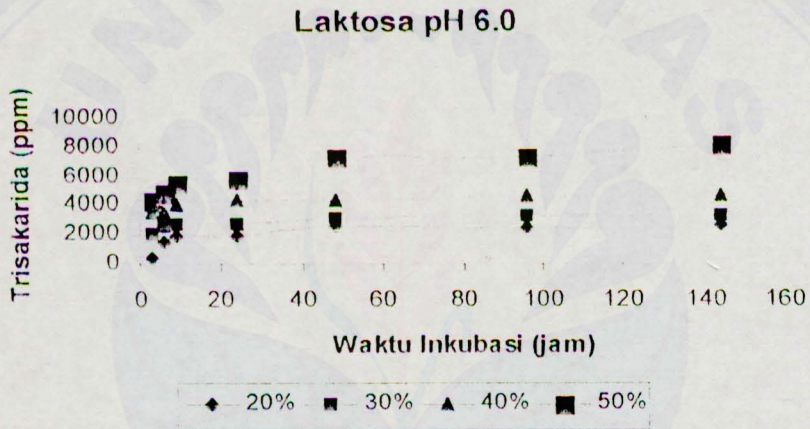
Pada **Tabel 6**, tampak bahwa semua perlakuan memberikan hasil berbeda nyata, yang berarti dengan meningkatnya konsentrasi substrat laktosa, akan meningkatkan produk trisakarida dari hasil sintesa oleh enzim.

Dari semua pembahasan diatas, secara umum dapat dikatakan bahwa pH dan konsentrasi dari substrat memberikan pengaruh yang sangat nyata bagi besarnya produk disakarida dan trisakarida yang dihasilkan dari reaksi sintesa oleh enzim β -galaktosidase asal *Bacillus circulans*. **Gambar 6** menunjukkan bahwa pH dan konsentrasi substrat laktosa secara umum mempengaruhi besarnya produk hasil sintesa.

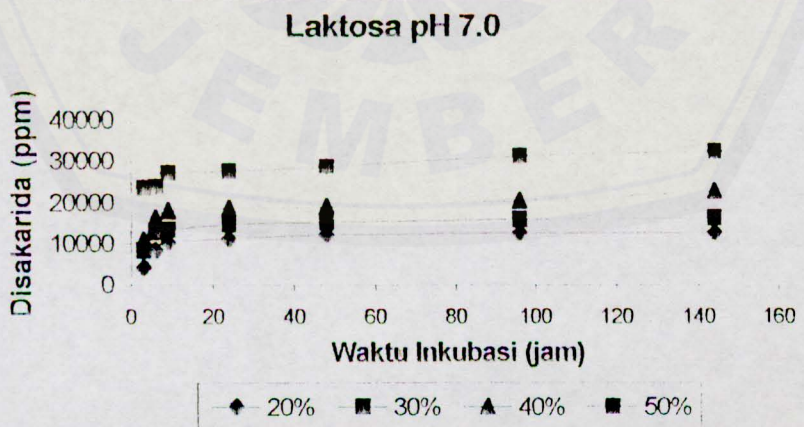
a)



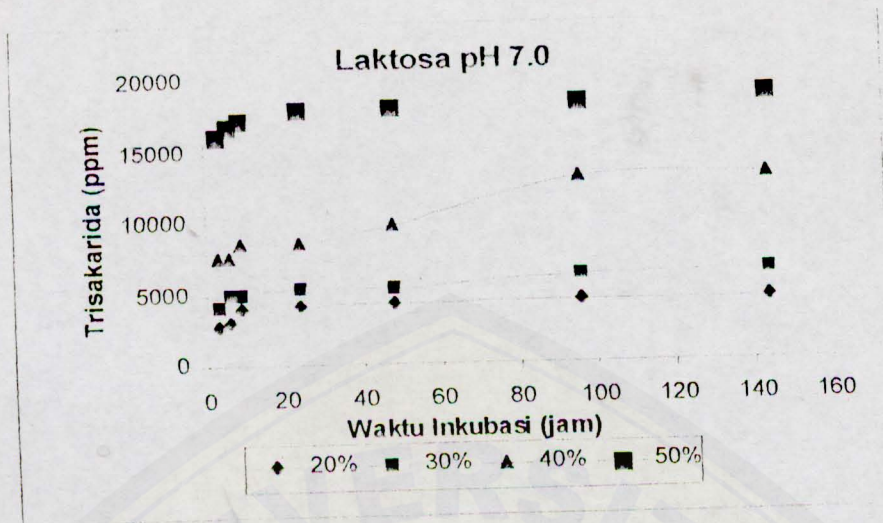
d)



c)



d)



Gambar 6. Disakarida dan Trisakarida yang Dihasilkan oleh Substrat Laktosa pada pH 6.0 dan 7.0 dalam Waktu Inkubasi 0-144 jam.

Dari **Gambar 6** tersebut tampak jelas bahwa disakarida dan trisakarida yang dihasilkan dari reaksi sintesa akan meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi substrat laktosa baik pada pH 6.0 maupun pH 7.0. Sedangkan pengaruh waktu inkubasi yaitu jumlah produk akan meningkat sampai dengan waktu inkubasi 24 jam dan setelah itu produk yang dihasilkan cenderung stabil jumlahnya.

Hal ini disebabkan karena dengan lamanya waktu inkubasi maka kesempatan enzim untuk melakukan reaksi hidrolisa dan sintesa semakin besar, sehingga akan meningkatkan jumlah produk yang dihasilkan. Namun pada saat tertentu jumlah produk menjadi stabil, karena aktivitas enzimatis sudah tidak ada akibat jumlah enzim yang semakin berkurang sementara substrat masih tersisa.

4.2 Pengaruh pH

Pengaruh pH pada enzim adalah untuk stabilitas enzim itu sendiri, dimana komponen utama enzim yaitu protein sangat dipengaruhi oleh pH. Perubahan pH berpengaruh terhadap struktur molekul enzim, sehingga

berpengaruh terhadap konformasi protein enzim. Pada pH optimum, konformasi dari molekul enzim sangat sesuai untuk aktivitasnya.

Selain itu, pH juga berpengaruh pada sifat-sifat protein dari enzim, yaitu kelarutan, viskositas, dan tingkat ionisasi. Pada pH optimum, tingkat kelarutannya tinggi, sehingga enzim terdistribusi merata keseluruh bagian sistem yang dikatalis dan ikatan dengan substrat semakin kuat. Pada pH optimum, viskositas akan menurun, dan hal ini menyebabkan kelarutan enzim semakin tinggi. Sedangkan tingkat ionisasi sangat berkaitan dengan gugus prototropik dari enzim, yaitu gugus yang terdapat pada sisi aktif yang mempunyai kemampuan dapat terionisasi. Agar bisa mengikat substrat, gugus prototropik harus terionisasi. Bila pH-nya tidak optimum, maka gugus tersebut tidak dapat terionisasi dan akibatnya enzim tidak dapat mengikat substrat.

Dalam penelitian ini pengaruh pH pada pemecahan substrat (laktosa dan galaktosa), sangat nampak. Selanjutnya akan diulas lebih rinci pengaruh pH pada setiap substrat yang berbeda beserta hasilnya baik disakarida maupun trisakarida. Hasil sidik ragam pengaruh pH dan konsentrasi substrat laktosa dalam produksi disakarida (GalOS_2) dapat dilihat pada **Tabel 7**.

Tabel 7. Sidik Ragam Pengaruh pH dan Konsentrasi Substrat Laktosa dalam Produksi Disakarida

Sumber Keragaman	DB	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F-hitung		F-tabel	
						0.05	0.01
Perlakuan	7	933084092	133297727	458.3128	**	2.39	3.46
P	1	32944969.6	32944969.6	113.2735	**	4.35	8.1
C	3	881044389	293681463	1009.754	**	2.87	4.43
PC	3	19094733.1	6364911.04	21.88424	**	2.87	4.43
Galat	8	2326755.61	290844.451				
Total	15	935410848					

Ket : ** berbeda sangat nyata

Berdasarkan hasil sidik ragam untuk produk disakarida oleh substrat laktosa, menunjukkan bahwa pH dari substrat berpengaruh

sangat nyata pada banyaknya produksi disakarida. Sedangkan konsentrasi rata-rata produk dapat dilihat pada **Tabel 8** berikut.

Tabel 8. Pengaruh pH pada Substrat Laktosa dalam Produksi Disakarida dengan Waktu Inkubasi 24 jam.

Perlakuan	Konsentrasi rata-rata Produk	
	(ppm)	
P6	20717,798	
P7	17924,203	

Berdasarkan data konsentrasi rata-rata produk diatas (**Tabel 8**), ternyata enzim lebih baik bekerja pada pH 6.0. Namun demikian data tersebut menunjukkan bahwa pada kondisi pH yang berbeda enzim memiliki kemampuan yang hampir sama dalam melakukan reaksi sintesa. Keadaan ini diduga akibat enzim yang terlibat dalam reaksi sintesa secara alami akan mengalami proses stabilisasi oleh adanya laktosa. Stabilisasi ini telah memberikan proteksi pada setiap sisi aktif enzim terhadap lingkungan yang memberikan kekuatan ionisasi yang berbeda.

Pada produksi trisakarida dengan substrat laktosa, dari hasil sidik ragam tampak bahwa pH sangat berpengaruh pada produk trisakarida yang dihasilkan. Berikut ini hasil sidik ragam (**Tabel 9**) produk trisakarida dari substrat laktosa.

Tabel 9. Sidik Ragam Pengaruh pH dan Konsentrasi Substrat Laktosa dalam Produksi Trisakarida

Sumber Keragaman	DB	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F-hitung	F-tabel		
					0.05	0.01	
Perlakuan	7	435760404	62251486.3	1615.91	**	2.39	3.46
P	1	142366572	142366572	3695.519	**	4.35	8.1
C	3	239155324	79718441.2	2069.313	**	2.87	4.43
PC	3	54238508.8	18079502.9	469.3036	**	2.87	4.43
Galat	8	308192.889	38524.1111				
Total	15	436068597					

Ket : ** berbeda sangat nyata

Untuk hasil rata-rata produk trisakarida dapat dilihat pada **Tabel 10** berikut ini.

Tabel 10. Pengaruh pH pada Substrat Laktosa dalam Produksi Trisakarida dengan Waktu Inkubasi 24 jam.

Perlakuan	Konsentrasi rata-rata Produk	
	(ppm)	
P6	3712,094	
P7	8974,898	

Dalam sintesa trisakarida pada substrat laktosa, ternyata dari data diatas (**Tabel 10**) menunjukkan bahwa enzim lebih baik bekerja pada pH 7.0 dibandingkan pada pH 6.0, sehingga produk trisakarida yang dihasilkan pada pH 7.0 lebih banyak.

Pada produksi disakarida dengan substrat galaktosa, secara umum ternyata pH juga berpengaruh sangat nyata terhadap banyaknya disakarida yang dihasilkan. Keterangan tersebut dapat diketahui dari tabel sidik ragam (**Tabel 11**) di bawah ini.

Tabel 11. Sidik Ragam Pengaruh pH dan Konsentrasi Substrat Galaktosa pada Produksi Disakarida

Sumber Keragaman	DB	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F-hitung		F-tabel	
						0.05	0.01
Perlakuan	7	1547920.34	221131.476	170.6403	**	2.39	3.46
P	1	245925.089	245925.089	189.7728	**	4.35	8.1
C	3	1114094.47	371364.824	286.5708	**	2.87	4.43
PC	3	187900.774	62633.5915	48.33241	**	2.87	4.43
Galat	8	10367.1371	1295.89214				
Total	15	1558287.47					

Ket : ** berbeda sangat nyata

Pada **Tabel 12** berikut ini ditunjukkan data besarnya produk disakarida dari substrat galaktosa.

Tabel 12. Pengaruh pH pada Substrat Galaktosa dalam Produksi Disakarida dengan Waktu Inkubasi 24 jam.

Perlakuan	Konsentrasi rata-rata Produk	
	(ppm)	
P6	2799,859	
P7	3294,169	

Dari **Tabel 12** terlihat meskipun konsentrasi rata-rata produk dari kedua perlakuan berbeda nyata, namun hasilnya tidak terpaut jauh. Hal ini disebabkan enzim telah mengalami stabilisasi oleh substrat galaktosa, sehingga kemampuan dalam mensintesa produk hampir sama meskipun dalam kondisi pH yang berbeda.

Untuk produksi trisakarida dari substrat galaktosa, dari data hasil sidik ragam menunjukkan bahwa pH memberikan pengaruh sangat nyata terhadap banyaknya trisakarida yang dihasilkan, seperti tercantum dalam **Tabel 13** berikut.

Tabel 13. Sidik Ragam Pengaruh pH dan Konsentrasi Substrat Galaktosa pada Produksi Trisakarida

Sumber Keragaman	dB	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F-hitung	F-tabel		
					0.05	0.01	
Perlakuan	7	2351897.03	335985.291	2021.203	**	2.39	3.46
P	1	23072.1842	23072.1842	138.7965	**	4.35	8.1
C	3	2291976.44	763992.147	4595.985	**	2.87	4.43
PC	3	36848.4088	12282.8029	73.89026	**	2.87	4.43
Galat	8	1329.84269	166.230337				
Total	15	2353226.88					

Ket : ** berbeda sangat nyata

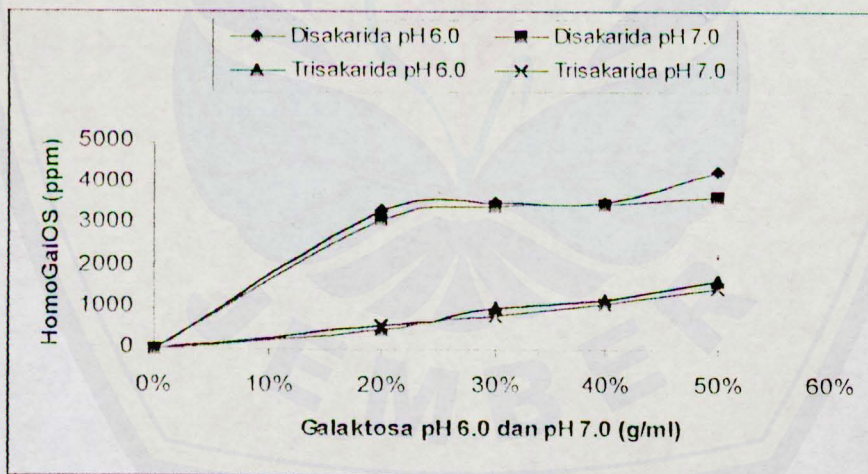
Sedangkan data produk trisakarida yang dihasilkan oleh substrat galaktosa dapat dilihat pada **Tabel 14**.

Tabel 14. Pengaruh pH pada Substrat Galaktosa dalam Produksi Trisakarida dengan Waktu Inkubasi 24 jam.

Perlakuan	Konsentrasi rata-rata Produk (ppm)
P6	887,511
P7	899,559

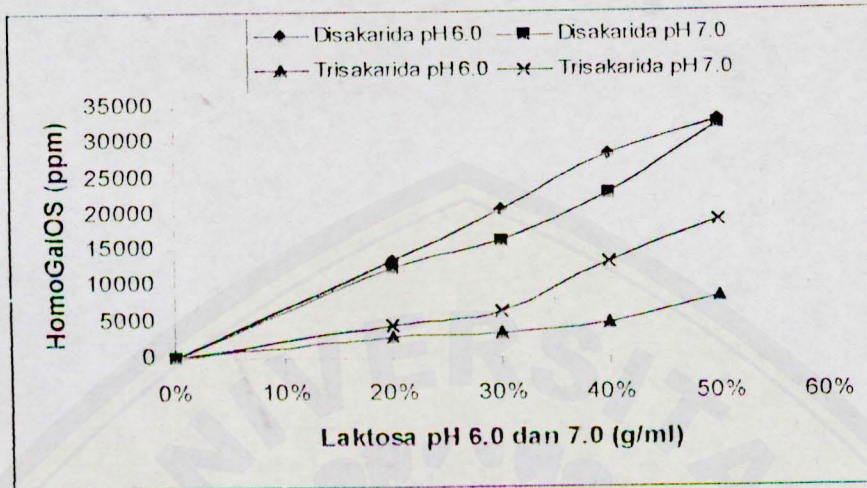
Dari **Tabel 14**, dapat dilihat bahwa pada produksi trisakarida dengan substrat galaktosa, enzim mampu bekerja dengan baik pada kedua jenis pH, namun enzim bekerja lebih baik pada pH 7.0. Dari inilah mengapa konsentrasi rata-rata produk pada pH 6.0 dan pH 7.0 memberikan hasil yang berbeda nyata.

Gambar 7 berikut menunjukkan pengaruh perbedaan pH pada hasil pemecahan substrat galaktosa.



Gambar 7. Produksi Disakarida dan Trisakarida dengan Substrat Galaktosa pada pH 6.0 dan 7.0.

Sedangkan untuk hasil homoGalOS dari substrat laktosa pada pH 6.0 dan 7.0 dapat ditunjukkan pada **Gambar 8** berikut.



Gambar 8. Produksi Disakarida dan Trisakarida dengan Substrat Laktosa pada pH 6.0 dan 7.0.

Dari **Gambar 7** dan **Gambar 8** terlihat bahwa pada pH 6.0, pemecahan substrat baik galaktosa maupun laktosa oleh enzim menunjukkan perbedaan yang nyata antara gula disakarida (GalOS_2) dan trisakarida (GalOS_3). Dalam hal ini, utamanya untuk substrat laktosa, gula disakarida yang terbentuk sangat tinggi dan akhirnya akan dapat menahan terbentuknya trisakarida, sehingga hasilnya jauh lebih sedikit.

Berbeda halnya dengan pH 6.0, hasil pemecahan substrat galaktosa dan laktosa pada pH 7.0 memberikan hasil gula disakarida yang hampir sama besar dengan trisakarida, meskipun jumlah disakarida masih lebih besar. Dalam hal ini terjadi kompetisi antara pembentukan disakarida dengan trisakarida.

Tabel 15. Besarnya HomoGalOS yang dihasilkan dari substrat Galaktosa (50 %) dan Laktosa (50 %) pada pH 6.0 dan 7.0 dalam waktu inkubasi selama 3 – 144 jam.

Jenis Substrat	Waktu Inkubasi (jam)	Konsentrasi HomoGalOS (ppm) yang Dihasilkan			
		PH 6.0		PH 7.0	
		GalOS ₂	GalOS ₃	GalOS ₂	GalOS ₃
Galaktosa (50 %)	3	1963,994	564,259	1626,432	457,175
	6	3832,733	1068,818	2635,679	1065,298
	9	3897,545	1139,892	3327,741	1299,098
	24	4161,702	1279,061	3427,905	1431,363
	48	4226,268	1416,065	3523,895	1403,339
	96	4231,424	1605,460	3599,018	1409,025
	144	4272,668	1627,392	3658,919	1484,567
Laktosa (50 %)	3	27183,388	4389,937	23605,974	16229,016
	6	28398,609	4925,361	23896,890	16903,655
	9	30007,365	5606,182	27205,401	17196,299
	24	31023,977	5824,143	27551,555	17886,056
	48	31078,478	7321,977	28618,249	18055,957
	96	32052,619	7337,951	31209,493	18355,144
	144	32873,322	8077,527	32257,774	18739,169

Dari keseluruhan data yang ada pada **Tabel 15** menunjukkan bahwa baik pada pH 6.0 maupun pH 7.0, hasil GalOS₂ dan GalOS₃ lebih banyak diperoleh dari substrat laktosa daripada galaktosa. Hal ini disebabkan, ketika laktosa digunakan sebagai substrat, enzim β -Galaktosidase berperan sangat aktif dalam reaksi hidrolisa yang menghasilkan glukosa dan galaktosa, maupun dalam reaksi sintesa yang menghasilkan GalOS₂ dan GalOS₃.

Dengan adanya reaksi hidrolisa ini (terbentuk galaktosa dan glukosa) akan menyebabkan terjadinya reaksi sintesa yang lebih bervariasi. Dari reaksi sintesa ini memungkinkan terbentuknya di-/trisakarida gabungan dari galaktosa dan glukosa (Gal-Glu) maupun

galaktosa dengan galaktosa yang lain (Gal-Gal), sehingga baik GalOS₂ maupun GalOS₃ yang dihasilkan akan lebih banyak.

Sedangkan pada substrat galaktosa, enzim β -Galaktosidase hanya memacu reaksi sintesa yang hanya menggunakan substrat monosakarida untuk membentuk disakarida dan trisakarida, sehingga gula di- maupun trisakarida yang dihasilkan lebih sedikit.

Dari data yang ada dapat diketahui bahwa reaksi yang menghasilkan produk disakarida maupun trisakarida lebih tinggi, adalah pada pH 6.0. Sedangkan pada pH 7.0, reaksi sintesa yang terjadi lebih banyak menghasilkan trisakarida, khususnya pada substrat laktosa.

4.3 Sintesa Heterogalakto-Oligosakarida

Dalam sintesa heterogalaktooligosakarida ini gula-gula yang digunakan sebagai aseptor adalah glukosa, mannososa, maltosa, dan sukrosa. Sedangkan sebagai donornya digunakan gula galaktosa. Konsentrasi campuran gula total adalah 50% (g/ml) dan inkubasi dilaksanakan selama 144 jam pada pH 6.0, dengan asumsi bahwa kondisi kesetimbangan dapat tercapai dengan mudah seperti halnya pada waktu produksi Homo-GalOS.

Dari hasil penelitian didapatkan bahwa galaktosa yang bertindak sebagai donor, mampu berikatan dengan gula-gula aseptor untuk selanjutnya melakukan reaksi sintesa Hetero-GalOS dengan katalis enzim β -galaktosidase. **Tabel 16** dibawah ini menunjukkan hasil produksi hetero-GalOS oleh galaktosa sebagai gula donor dengan beberapa gula aseptor.

Tabel 16. Hetero-GalOS Hasil Sintesa oleh β -Galaktosidase dari *Bacillus circulans*

Donor	Aseptor	Produk	Disakarida (ppm)	Trisakarida (ppm)
Galaktosa	Glukosa	Galaktosil-glukosa	6774	6407
Galaktosa	Mannosa	Galaktosil-mannosa	6939	6385
Galaktosa	Maltosa	Galaktosil-maltosa	76372	10887
Galaktosa	Sukrosa	Galaktosil-sukrosa	9977	6138

Dari data pada **Tabel 16** tersebut, produk galaktosil-glukosa menghasilkan disakarida dan trisakarida dengan jumlah yang hampir sama. Dalam hal ini reaksi yang terjadi antara Galaktosa dan Glukosa, tidak selalu berupa laktosa, karena ikatan yang terbentuk belum pasti ikatan β -1,4-galaktosidik. Kemungkinan ragam ikatan yang terbentuk pada produk hasil sintesa antara lain berupa β -1,3-galaktosidik maupun β -1,6-galaktosidik.

Pada reaksi ini kemungkinan disakarida yang terbentuk selain Gal-Glu adalah Gal-Gal. Dalam hal ini enzim β -galaktosidase akan mengikat dulu pada substrat yang spesifik yaitu galaktosa (sebagai donor) dan aktif membentuk Gal-Gal, kemudian diikuti pembentukan Gal-Glu. Sedangkan trisakarida yang terbentuk dapat berupa Gal-Gal-Gal dan Gal-Gal-Glu.

Reaksi yang melibatkan galaktosa dan manosa juga mampu menghasilkan produk Galaktosil-Mannosa yang hampir sama jumlahnya dengan produk Galaktosil-Glukosa, baik untuk disakarida maupun trisakarida. Kemungkinan reaksi yang terjadi adalah Gal-Man dan Gal-Gal untuk produk disakarida, serta Gal-Gal-Gal dan Gal-Gal-Man untuk produk trisakarida.

Pada reaksi yang melibatkan maltosa sebagai aseptor, reaksi yang terjadi sedikit lebih kompleks, karena maltosa merupakan disakarida yang terdiri dari dua molekul glukosa. Tetapi meskipun terdiri dari dua molekul glukosa, namun maltosa ini tidak akan terpecah oleh enzim. Hal ini disebabkan pada saat berlangsungnya reaksi, setelah berikatan dengan

gula donor (galaktosa) enzim hanya akan mengikat molekul glukosa pertama dari gula aseptor (maltosa). Kalaupun enzim sampai menyebar pada molekul glukosa kedua, kejadian ini sangat kecil kemungkinannya.

Dari **Tabel 16** menunjukkan bahwa, produk yang dihasilkan cukup besar, utamanya untuk disakarida. Untuk terbentuknya disakarida ini, kemungkinan reaksi yang terjadi adalah menghasilkan Gal-Gal dan sisa maltosa itu sendiri. Sedangkan kemungkinan trisakarida yang terbentuk adalah berupa Gal-Gal-Gal dan Gal-Malt.

Reaksi yang terjadi pada aseptor sukrosa tidak jauh berbeda dengan reaksi pada aseptor maltosa, meskipun produk yang dihasilkan berjumlah lebih kecil. Disakarida yang terbentuk dapat berupa Gal-Gal dan sisa sukrosa, sedangkan trisakaridanya dapat berupa Gal-Gal-Gal dan Gal-Suk.

Pada **Tabel 16** tersebut, utamanya untuk hasil dari gula aseptor maltosa dan sukrosa, disakarida yang terbentuk ada yang terdiri dari maltosa dan sukrosa itu sendiri. Berarti dalam hal ini, produk tersebut tidak dapat dikategorikan dalam GalOS, namun karena keduanya merupakan gula yang aman untuk dikonsumsi, maka dapat diikutkan dalam kelompok produk (disakarida) yang dihasilkan dari reaksi sintesa.

4.4 Struktur Homo-GalOS dan Hetero-GalOS

Untuk mengetahui struktur GalOS, maka gula-gula hasil analisa HPLC harus dipisahkan terlebih dahulu menjadi fraksi-fraksi. Pemisahan GalOS menjadi fraksi-fraksi monosakarida, disakarida, dan trisakarida dilakukan dengan menggunakan kromatografi gel dalam kolom Bio-Gel P-2. Gel ini memiliki kemampuan untuk memisahkan gula (karbohidrat) menjadi fraksi dari monosakarida sampai pentasakarida.

Fraksi yang pertama kali keluar dari kolom gel adalah gula dengan berat molekul (BM) tertinggi. Dalam penelitian ini, BM tertinggi adalah trisakarida, diikuti disakarida dan yang terakhir keluar adalah

monosakarida. Fraksi-fraksi yang mengandung disakarida dan trisakarida dikumpulkan, dibekukan, dan selanjutnya dikeringkan dalam *freeze dryer*.

Penentuan struktur GalOS dilakukan dengan teknik metilasi yang dilanjutkan dengan proses hidrolisa, reduksi dan asetilasi. Reaksi metilasi dilakukan dengan menggunakan larutan dimethylsulfoxide (DMSO) dan iodomethane (CH_3I). Untuk proses hidrolisa menggunakan larutan asam trifluoroasetat (TFA) dan proses reduksi menggunakan NaBD_4 , sedangkan dalam reaksi asetilasi dilakukan dengan asetil anhidrid ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_3$).

Disakarida dan trisakarida dalam larutan DMSO dimetilasi dengan iodomethane guna menghasilkan Disakarida Metilasi Parsial (DMP) dan Trisakarida Metilasi Parsial (TMP), dimana semua hidrogen dari grup hidroksil bebas digantikan oleh methyl (CH_3^+). Selanjutnya komponen DMP dan TMP dihidrolisa dalam TFA suhu 100°C guna membentuk Monosakarida Metilasi Parsial (MMP). Komponen MMP ini direduksi dengan NaBH_4 menjadi Alditol Metilasi Parsial (AMP) dimana hidrogen pada posisi ikatan mengalami asetilasi oleh anhidrid asetat guna membentuk Alditol Asetat Metilasi Parsial (AAMP). Selanjutnya turunan dari disakarida dan trisakarida disuntikkan dalam gas kromatografi-mass spektrofotometri (GC-MS) untuk diidentifikasi strukturnya.

Untuk mengetahui lebih jelas proses teknik metilasi, dapat dicontohkan pada penentuan struktur disakarida (galaktosa –glukosa) hasil sintesa enzim β -galaktosidase asal *Bacillus circulans* yang menghasilkan struktur ikatan Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glu. Pada proses tersebut, menghasilkan dua mass spectra dari fragmentasi turunan disakarida yaitu 1,5-di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methylgalacitol yang merupakan galaktosa terminal non pereduksi dan 1,4,5-tri-O-acetyl-2,3,6-tri-O-methylglucitol. Dua jenis spectra ini selanjutnya akan menghasilkan jenis ikatan 1,4-galaktosidik (Gal- β -(1 \rightarrow 4)-Glu).

Secara keseluruhan struktur homo-GalOS hasil sintesa laktosa dan galaktosa oleh enzim β -Galaktosidase asal *Bacillus circulans* dapat dilihat dalam **Tabel 17**. Dari **Tabel 17** tersebut menunjukkan bahwa enzim β -galaktosidase asal *Bacillus circulans* memiliki daya regioselektif yang cukup baik dalam sintesa disakarida dengan membentuk ikatan β -1,4-galaktosidik.

Sedangkan jenis ikatan yang terbentuk pada GalOS hasil sintesa Hetero-GalOS yang dapat dilihat pada **Tabel 18**. Pada sintesa hetero-GalOS ini, alasan penggunaan glukosa, mannososa, maltosa, dan sukrosa sebagai aseptor, karena gula-gula ini tidak berbahaya untuk dikonsumsi. Sedangkan produk GalOS yang dihasilkan tetap aman untuk dikonsumsi karena sama dengan GalOS yang terkandung pada ASI.

Dari hasil metilasi terhadap struktur hetero-GalOS dapat dijelaskan bahwa enzim tersebut masih memiliki regioselektif yang cukup baik dalam sintesa Gal-Glu dan Gal-Malt dengan membentuk ikatan β 1,4-galaktosidik. Enzim asal *Bacillus circulans* dengan selektif mampu membentuk ikatan β 1,4-galaktosidik antara galaktosa (donor) dan gugus glukosa dari aseptor namun tidak selektif terhadap gugus mannososa dari aseptor.

Hal ini menunjukkan bahwa enzim ini hanya mampu membentuk ikatan β 1,4-galaktosidik dengan aseptor yang memiliki gugus glukosa. Kenyataan ini menunjukkan bahwa tingkat regioselektif enzim terhadap bentuk ikatan sangat dipengaruhi oleh sumber enzim dan struktur aseptor yang tersedia.

Tabel 17. Estimasi Struktur Homo-GalOS Hasil Sintesa dari Laktosa dan Galaktosa sebagai Substrat.

Disakarida dari laktosa		Disakarida dari galaktosa	
Gal β (1 \rightarrow 4)Gal		Gal β (1 \rightarrow 4)Gal	
Gal β (1 \rightarrow 4)Glu		Gal β (1 \rightarrow 6)Gal	

Trisakarida dari laktosa		Trisakarida dari galaktosa	
Gal β (1 \rightarrow 4)Gal β (1 \rightarrow 4)Gal		Gal β (1 \rightarrow 4)Gal β (1 \rightarrow 4)Gal	
Gal β (1 \rightarrow 4)Gal β (1 \rightarrow 4)Glu			

Tabel 18. Estimasi Struktur dari Hetero-GalOS Hasil Sintesa oleh β -Galaktosidase dari *Bacillus circulans*

Gula	Jenis Ikatan	Area Relatif (%)	Rasio Produk (%)
Galaktosil-glukosa			
2,3,4,6-Me ₄ Gal	t-gal	52,67	Gal β (1 \rightarrow 4)Glu (100)
2,3,6-Me ₃ Glu	4-glu	47,33	
Galaktosil-mannosa			
2,3,4,6-Me ₄ Gal	t-gal	28,58	Gal β (1 \rightarrow 4)Man 52,9)
2,3,6-Me ₃ Man	4-man	37,79	
2,3,4-Me ₃ Man	6-man	33,63	
Galaktosil-maltosa			
2,3,4,6-Me ₄ Gal	t-gal	25,83	Gal β (1 \rightarrow 4)Glu α (1 \rightarrow 4)Glu (100)
2,3,6-Me ₃ Glu	4-glu	38,62	
2,3,4-Me ₃ Glu	6-glu	35,63	
Galaktosil-sukrosa			
2,3,4,6-Me ₄ Gal	t-gal	31,99	Gal β (1 \rightarrow 4)Glu α (1 \rightarrow 2)Fru (100)
2,3,4-Me ₃ Gal	6-glu	17,51	
3,4,6-Me ₃ Gal	2-gal	50,50	

V .KESIMPULAN DAN SARAN

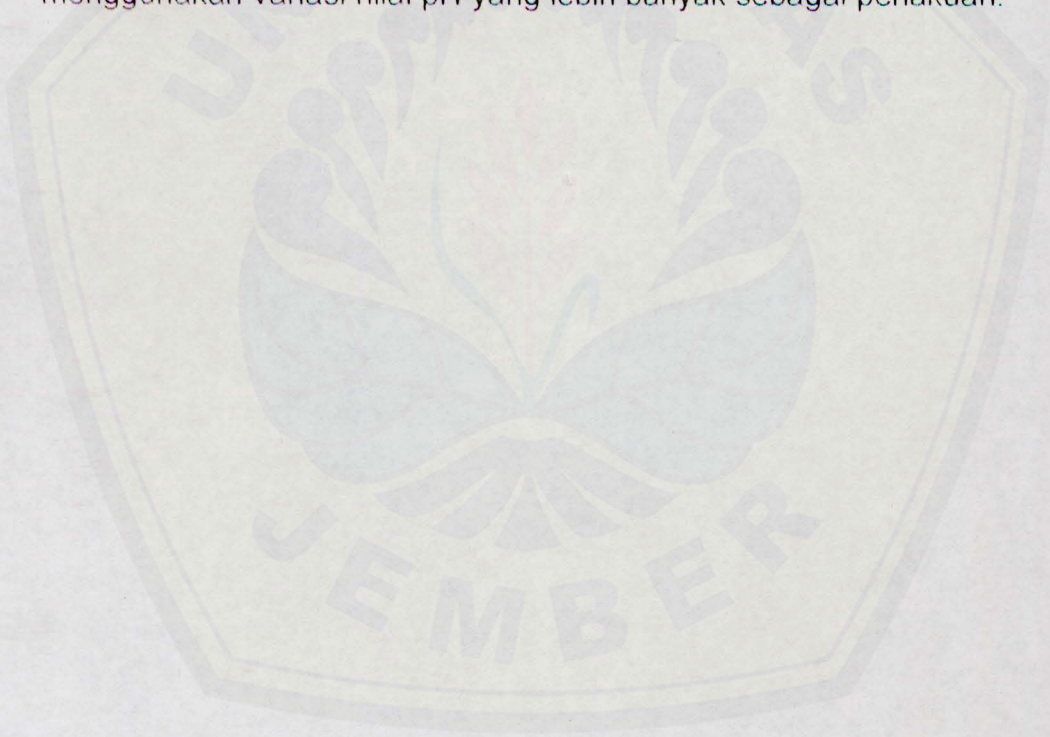
5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan pengaruh berbagai konsentrasi dan pH larutan substrat terhadap besarnya produk GalOS baik disakarida maupun trisakarida, maka dapat diberikan beberapa kesimpulan sebagai berikut :

1. Besarnya konsentrasi dan pH substrat memberikan pengaruh sangat nyata terhadap jumlah dan bentuk GalOS yang dihasilkan, baik pada substrat galaktosa maupun laktosa.
2. Semakin tinggi konsentrasi substrat sampai konsentrasi 50%, akan semakin meningkatkan jumlah GalOS yang diproduksi, dimana substrat laktosa memberikan produk yang lebih besar daripada galaktosa.
3. Semakin bertambahnya waktu inkubasi akan meningkatkan pula produktivitas enzim sampai mencapai waktu inkubasi 24 jam, kemudian cenderung stabil.
4. Produk disakarida tertinggi dihasilkan oleh substrat laktosa (50%) pada pH 6.0 dengan waktu inkubasi 144 jam yaitu sebesar 32873,322 ppm. Sedangkan trisakarida tertinggi dihasilkan oleh substrat laktosa (50%) pada pH 7.0 dengan waktu inkubasi 144 jam, sebesar 18739,169 ppm.
5. Untuk produk hetero-GalOS, produk yang paling besar dihasilkan adalah Galaktosil-Maltosa, yaitu disakarida sebesar 76372 ppm (87,52%) dan trisakarida sebesar 10887 ppm (12,48%).
6. Enzim β -Galaktosidase asal *Bacillus circulans*, menunjukkan spesifikasi regioselektif yang tinggi dalam membentuk ikatan β -1,4-galaktosidik baik dalam produk homo-GalOS maupun hetero-GalOS. Spesifitas ini cenderung terbentuk ketika galaktosa (donor) berikatan dengan glukosa (aseptor).

5.2 Saran

1. Bila melihat dari hasil penelitian yang berkaitan dengan waktu inkubasi, maka untuk penelitian selanjutnya waktu inkubasi yang digunakan cukup sampai 24 jam.
2. Hasil penelitian menunjukkan bahwa produktivitas enzim mulai terhenti atau stabil setelah waktu inkubasi 24 jam. Oleh karenanya kemungkinan penelitian dapat ditingkatkan efisiensinya bila diketahui efektivitas penggunaan substrat oleh enzim. Sehingga perlu dilakukan penelitian dengan mengamati efisiensi penggunaan substrat.
3. pH substrat yang digunakan dalam penelitian ini merupakan pH netral (6.0 dan 7.0), sehingga perlu dicoba untuk penelitian selanjutnya menggunakan variasi nilai pH yang lebih banyak sebagai perlakuan.



- Bach-Khudson, K.E., 2000, **Non-Digestible Oligosaccharides**, Danish Institute of Agricultural Sciences, Tjele, Denmark.
- Bennion, M., 1980, **The Science of Food**, John Wiley & Sons, U.S.A.
- Broste P., 1997, **Functional Food in Europe**, Food Engineering International.
- Bucke, C., dan Rastall, R.A., 1990, Synthesising Sugar by Enzymes in Reverse, **Chemistry in Britain**, 26; 676-678.
- Cichoke, A., 2000, Probiotics Balance Digestion and Improve Overall Health, **Nutrition Science News**, 26; 2-4.
- El Khadem, H.S., 1988, **Carbohydrate Chemistry Monosaccharides and Their Oligomers**, Academic Press, San Diego.
- Eskin, M.N.A., 1990, **Biochemistry of Foods**, Academic Press, Inc., California.
- Girindra, A., 1993, **Biokimia I**, P.T. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Ichikawa, Y., Look, G.C., dan Wong, C.H., 1992, Enzyme-Catalyzed Oligosaccharide Synthesis, **Analytical Biochem**, 202; 215-238.
- Iwasaki, K., Nakajima, M., dan Nakao, S., 1996, Galaktooligosaccharide Production from Lactose by an Enzymic Batch Reaction Using β -Galaktosidase, **Process Biochemistry**, 31; 69-76.
- Kurniasih, D., 2001, **Prebiotik Atasi Masalah Diare**, Tabloid Nakita, P.T.Gramedia, Jakarta.
- Larsson, P.O., Hedbys, L., Svensson, S., dan Mosbach, K., 1972, **Disaccharide Synthesis with Immobilized β -Galactosidase**, Academic Press, New York.
- Monsan, P., dan Paul, F., 1995, Enzymatic Synthesis of Heterosaccharides, **FEMS Microbiology Reviews**, 16; 187-192.
- Montgomery, R., Conway, T.W., Spector, A.A., 1993, **Biokimia Berorientasi pada Kasus Klinik**, Binarupa Aksara, Jakarta.

- Muchtadi, D., dan Wijaya, C.H., 1996, **Kursus Singkat "Makanan Fungsional dan Keamanan Pangan"**, PAU Pangan dan Gizi-UGM, Yogyakarta.
- Nakano, H., Hamayasu, K., Fujita, K., Hara, K., Chi, M., Yashizumi, H., dan Kitahata, S., 1995, Synthesis of 2-deoxy-D-glucose by Glucoamylase and α -glucosidase, **Biosci, Biotech. Biochemistry**, 59; 1732-1736.
- Nuraida, L., 1996, **Kursus Singkat "Makanan Fungsional dan Keamanan Pangan"**, PAU Pangan dan Gizi-UGM, Yogyakarta.
- Rastall, R.A., Adlard, M.W., dan Bucke, C., 1991, Synthesis of Heterooligosaccharides by Glucoamilase in reverse, **Biotechnology Letters**, 13; 501-504.
- Rastall, R.A., Pikett, S.F., Adlard, M.W., dan Bucke, C., 1992a, Synthesis of Oligosaccharides by Reversal of a fungal β -glukanase, **Biotechnology letters**, 14; 373-378.
- Rastall, R.A., Rees, N.H., Wait, R., Adlard, M.W., Bucke, C., 1992b, α -mannosidase-catalyzed Synthesis of Novel Manno-, Lyxo-, and Heteromanno-oligosaccharides : a Comparison of Kinetically and thermodynamically Mediated Approaches, **Enzyme microbial Technology**, 14; 53-57.
- Stefferd, A., 1959, **Food, The Yearbook of Agriculture**, The U.S. Government Printing Office, Washington D.C.
- Suwasono, S., dan Rastall, R.A., 1996, A Highly Regioselective Synthesis of Mannobiose and Mannotriose by Reverse Hydrolysis Using specific 1,2- α -mannosidase from *Aspergillus phoenicis*, **Biotechnology Letters**, 18; 851-856..
- Suwasono, S., dan Rastall, R.A., 1998, Enzymatic Synthesis of Manno and Heteromanno-oligosaccharides Using α -mannosidase : A Comparative Study of linkage-Specific and non-Linkage-Specific Enzymes, **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 73; 37-42.
- Winarno, F.G., 1997, **Kimia Pangan dan Gizi**, P.T. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Zarate, S., dan Lopez-Leiva, M.H., 1990, Oligosaccharide Formation During Enzymatic Lactose Hydrolysis : A Literatur Review, **Journal of Food Protection, Sweden**, 53; 262-268.

Lampiran : 1

Data : Hasil Produksi Homo-Galaktooligosakarida (ppm) Oleh Enzim β -Galaktosidase asal *Bacillus circulans* dengan Substrat Galaktosa dan Laktosa (20%-50% g/ml), pada pH 6.0 dan 7.0 dengan Waktu Inkubasi 3, 6, 9, 24, 48, 96, dan 144 jam.

Substrat : Galaktosa Enzim : B-Galactosidase
 Sumber : *Bacillus circulans* pH : 6,0

Total gula (%)	Inkubasi (jam)	YIELD (%)			Konsentrasi 1 (ppm)	Konsentrasi 2 (ppm)	Konsentrasi rata-rata (ppm)
		Area 1	Area 2	Area ave			
20	3	2,960	2,875	2,918	1,453.355	1411.620	1432.488
		960	850	905	259.928	230.144	245.036
	6	5,105	4,968	5,037	2,506.547	2439.280	2472.913
		1,287	1,195	1,241	348.466	323.556	336.011
	9	5,795	5,698	5,747	2,845.336	2797.709	2821.522
		1,324	1,305	1,315	358.484	353.339	355.912
	24	6,543	6,497	6,520	3,212.602	3190.016	3201.309
		1,592	1,487	1,540	431.047	402.617	416.832
	48	6,790	6,680	6,735	3,333.879	3279.869	3306.874
		1,687	1,571	1,629	456.769	425.361	441.065
	96	6,811	6,780	6,796	3,344.190	3328.969	3336.579
		1,721	1,697	1,709	465.975	459.477	462.726
	144	6,881	6,701	6,791	3,378.560	3290.180	3334.370
		1,792	1,672	1,732	485.199	452.708	468.953
30	3	3,835	3,799	3,817	1,882.979	1865.303	1874.141
		1,425	1,502	1,464	385.830	406.679	396.255
	6	6,745	6,697	6,721	3,311.784	3288.216	3300.000
		2,875	2,769	2,822	778.430	749.729	764.079
	9	6,857	6,852	6,855	3,366.776	3364.321	3365.548
		2,954	2,897	2,926	799.819	784.386	792.103
	24	6,925	6,789	6,857	3,400.164	3333.388	3366.776
		3,100	2,987	3,044	839.350	808.755	824.052
	48	7,057	7,100	7,079	3,464.975	3486.088	3475.532
		3,275	3,325	3,300	886.733	900.271	893.502
	96	7,200	7,187	7,194	3,535.188	3528.805	3531.997
		3,418	3,378	3,398	925.451	914.621	920.036
	144	7,167	7,251	7,209	3,518.985	3560.229	3539.607
		3,588	3,574	3,581	971.480	967.690	969.585

(lanjutan)

40	3	3,914	3,925	3,920	1,921.768	1927.169	1924.468
		1,952	1,897	1,925	528.520	513.628	521.074
	6	6,750	6,678	6,714	3,314.239	3278.887	3296.563
		3,656	3,652	3,654	989.892	988.809	989.350
	9	6,812	6,789	6,801	3,344.681	3333.388	3339.034
		3,746	3,705	3,726	1,014.260	1003.159	1008.709
	24	6,875	6,780	6,828	3,375.614	3328.969	3352.291
		3,817	3,792	3,805	1,033.484	1026.715	1030.099
	48	7,050	6,915	6,983	3,461.538	3395.254	3428.396
		3,975	3,890	3,933	1,076.264	1053.249	1064.756
	96	7,175	7,100	7,138	3,522.913	3486.088	3504.501
		4,150	4,201	4,176	1,123.646	1137.455	1130.551
	144	7,244	7,235	7,240	3,556.792	3552.373	3554.583
		4,292	4,263	4,278	1,162.094	1154.242	1158.168
50	3	3,998	4,002	4,000	1,963.011	1964.975	1963.993
		2,012	2,156	2,084	544.765	583.755	564.260
	6	7,817	7,795	7,806	3,838.134	3827.332	3832.733
		3,975	3,920	3,948	1,076.264	1061.372	1068.818
	9	7,980	7,896	7,938	3,918.167	3876.923	3897.545
		4,292	4,128	4,210	1,162.094	1117.690	1139.892
	24	8,431	8,521	8,476	4,139.607	4183.797	4161.702
		4,750	4,698	4,724	1,286.101	1272.022	1279.061
	48	8,565	8,650	8,608	4,205.401	4247.136	4226.268
		5,250	5,210	5,230	1,421.480	1410.650	1416.065
	96	8,611	8,625	8,618	4,227.987	4234.861	4231.424
		5,923	5,936	5,930	1,603.700	1607.220	1605.460
	144	8,706	8,698	8,702	4,274.632	4270.704	4272.668
		6,043	5,978	6,011	1,636.191	1618.592	1627.392

Substrat : Galaktosa Enzim : B-Galactosidase
 Sumber : Bacillus circulans pH : 7,0

Gula (%)	Inkubasi (jam)	YIELD (%)			Konsentrasi 1 (ppm)	Konsentrasi 2 (ppm)	Konsentrasi rata-rata (ppm)
		Area 1	Area 2	Area ave			
20	3	2,885	2,900	2,893	1,416.530	1,423.895	1,420.213
		761	750	756	206.047	203.069	204.558
	6	5,716	5,721	5,719	2,806.547	2,809.002	2,807.774
		1,301	1,299	1,300	352.256	351.715	351.986
	9	5,870	5,875	5,873	2,882.160	2,884.615	2,883.388
		1,575	1,560	1,568	426.444	422.383	424.413
	24	6,160	6,200	6,180	3,024.550	3,044.190	3,034.370
		1,650	1,625	1,638	446.751	439.982	443.366
	48	6,175	6,200	6,188	3,031.915	3,044.190	3,038.052
		1,775	1,805	1,790	480.596	488.718	484.657
	96	6,250	6,287	6,269	3,068.740	3,086.907	3,077.823
		1,900	1,894	1,897	514.440	512.816	513.628
	144	6,338	6,412	6,375	3,111.948	3,148.282	3,130.115
		2,000	2,078	2,039	541.516	562.635	552.076
30	3	2,975	3,012	2,994	1,460.720	1,478.887	1,469.804
		1,225	1,298	1,262	331.679	351.444	341.561
	6	5,920	6,078	5,999	2,906.710	2,984.288	2,945.499
		2,445	2,478	2,462	662.004	670.939	666.471
	9	6,560	6,512	6,536	3,220.949	3,197.381	3,209.165
		2,640	2,457	2,549	714.801	665.253	690.027
	24	6,750	6,798	6,774	3,314.239	3,337.807	3,326.023
		2,765	2,845	2,805	748.646	770.307	759.477
	48	6,825	6,952	6,889	3,351.064	3,413.421	3,382.242
		2,850	2,900	2,875	771.661	785.199	778.430
	96	6,891	6,789	6,840	3,383.470	3,333.388	3,358.429
		2,901	3,012	2,957	785.469	815.523	800.496
	144	6,913	7,100	7,007	3,394.272	3,486.088	3,440.180
		3,005	2,978	2,992	813.628	806.318	809.973
40	3	3,150	3,200	3,175	1,546.645	1,571.195	1,558.920
		1,375	1,398	1,387	372.292	378.520	375.406
	6	6,100	5,999	6,050	2,995.090	2,945.499	2,970.295
		2,750	2,798	2,774	744.585	757.581	751.083
	9	6,750	6,801	6,776	3,314.239	3,339.280	3,326.759
		2,917	3,012	2,965	789.801	815.523	802.662
	24	6,815	6,987	6,901	3,346.154	3,430.606	3,388.380
		3,521	3,600	3,561	953.339	974.729	964.034
	48	6,975	7,100	7,038	3,424.714	3,486.088	3,455.401
		3,624	3,698	3,661	981.227	1,001.264	991.245
	96	7,100	7,215	7,158	3,486.088	3,542.553	3,514.321
		3,775	3,845	3,810	1,022.112	1,041.065	1,031.588
	144	7,051	7,125	7,088	3,462.029	3,498.363	3,480.196
		3,919	4,012	3,966	1,061.101	1,086.282	1,073.691

(lanjutan)

50	3	3,275	3,350	3,313	1,608.020	1,644.845	1,626.432
		1,627	1,750	1,689	440.523	473.827	457.175
	6	5,315	5,421	5,368	2,609.656	2,661.702	2,635.679
		3,891	3,978	3,935	1,053.520	1,077.076	1,065.298
	9	6,775	6,780	6,778	3,326.514	3,328.969	3,327.741
		4,760	4,836	4,798	1,288.809	1,309.386	1,299.097
	24	6,951	7,012	6,982	3,412.930	3,442.881	3,427.905
		4,950	5,623	5,287	1,340.253	1,522.473	1,431.363
	48	7,101	7,253	7,177	3,486.579	3,561.211	3,523.89
		5,151	5,215	5,183	1,394.675	1,412.004	1,403.33
	96	7,315	7,345	7,330	3,591.653	3,606.383	3,599.01
		5,210	5,198	5,204	1,410.650	1,407.401	1,409.02
	144	7,441	7,463	7,452	3,653.519	3,664.321	3,658.92
		5,466	5,500	5,483	1,479.964	1,489.170	1,484.56

Substrat : Laktosa Enzim : B-Galactosidase
Sumber : Bacillus circulans pH : 6,0

Total gula (%)	Inkubasi (jam)	YIELD (%)			Konsentrasi 1 (ppm)	Konsentrasi 2 (ppm)	Konsentrasi rata-rata (ppm)
		Area 1	Area 2	Area ave			
20	3	4,403	4,370	4,387	2,161.866	2,145.663	2,153.76
		1,224	1,524	1,374	331.408	412.635	372.02
	6	14,152	13,850	14,001	6,948.609	6,800.327	6,874.46
		5,553	5,261	5,407	1,503.520	1,424.458	1,463.98
	9	22,110	21,998	22,054	10,855.974	10,800.982	10,828.47
		6,978	6,875	6,927	1,889.350	1,861.462	1,875.40
	24	23,996	22,568	23,282	11,781.997	11,080.851	11,431.42
		7,150	7,021	7,086	1,935.921	1,900.993	1,918.45
	48	23,988	22,568	23,278	11,778.069	11,080.851	11,429.46
		9,395	9,421	9,408	2,543.773	2,550.812	2,547.29
	96	25,454	24,770	25,112	12,497.872	12,162.029	12,329.95
		9,598	8,765	9,182	2,598.736	2,373.195	2,485.96
	144	27,546	26,589	27,068	13,525.041	13,055.155	13,290.09
		9,736	9,657	9,697	2,636.101	2,614.711	2,625.40
30	3	23,281	21,102	22,192	11,430.933	10,361.047	10,895.99
		7,557	7,400	7,479	2,046.119	2,003.610	2,024.86
	6	25,364	24,368	24,866	12,453.682	11,964.648	12,209.16
		9,736	9,632	9,684	2,636.101	2,607.942	2,622.02
	9	28,589	27,586	28,088	14,037.152	13,544.681	13,790.91
		9,924	9,687	9,806	2,687.004	2,622.834	2,654.91
	24	33,028	31,254	32,141	16,216.694	15,345.663	15,781.17
		10,182	10,154	10,168	2,756.859	2,749.278	2,753.06
	48	31,174	30,254	30,714	15,306.383	14,854.664	15,080.52
		11,637	11,254	11,446	3,150.812	3,047.112	3,098.96
	96	37,007	36,027	36,517	18,170.376	17,689.198	17,929.78
		12,031	11,698	11,865	3,257.491	3,167.329	3,212.41
	144	43,191	40,125	41,658	21,206.710	19,701.309	20,454.01
		12,204	11,998	12,101	3,304.332	3,248.556	3,276.44

(lanjutan)

40	3	25,006	24,658	24,832	12,277.905	12,107.038	12,192.471
		13,004	12,687	12,846	3,520.939	3,435.108	3,478.023
	6	43,191	42,789	42,990	21,206.710	21,009.329	21,108.020
		13,534	12,689	13,112	3,664.440	3,435.650	3,550.045
	9	48,438	45,667	47,053	23,782.979	22,422.422	23,102.700
		15,602	14,552	15,077	4,224.368	3,940.072	4,082.220
	24	51,353	49,000	50,177	25,214.239	24,058.920	24,636.579
		16,370	15,782	16,076	4,432.310	4,273.105	4,352.708
	48	53,550	51,265	52,408	26,292.962	25,171.031	25,731.997
		16,569	15,471	16,020	4,486.191	4,188.899	4,337.545
	96	54,258	52,451	53,355	26,640.589	25,753.355	26,196.972
		17,102	16,993	17,048	4,630.505	4,600.993	4,615.749
	144	58,804	56,321	57,563	28,872.668	27,653.519	28,263.093
		17,636	16,338	16,987	4,775.090	4,423.646	4,599.368
50	3	56,064	54,663	55,364	27,527.332	26,839.444	27,183.388
		16,431	15,996	16,214	4,448.827	4,331.047	4,389.937
	6	58,804	56,873	57,839	28,872.668	27,924.550	28,398.609
		18,770	17,612	18,191	5,082.130	4,768.592	4,925.361
	9	61,874	60,356	61,115	30,380.033	29,634.697	30,007.365
		21,046	20,365	20,706	5,698.375	5,513.989	5,606.182
	24	64,371	62,000	63,186	31,606.056	30,441.899	31,023.977
		22,836	20,185	21,511	6,183.032	5,465.253	5,824.143
	48	64,578	62,015	63,297	31,707.692	30,449.264	31,078.478
		27,498	26,587	27,043	7,445.307	7,198.646	7,321.977
	96	66,963	63,598	65,281	32,878.723	31,226.514	32,052.619
		28,414	25,789	27,102	7,693.321	6,982.581	7,337.951
	144	67,317	66,587	66,952	33,052.537	32,694.108	32,873.322
		30,870	28,796	29,833	8,358.303	7,796.751	8,077.527

Substrat : Laktosa Enzim : B-Galactosidase
 Sumber : Bacillus circulans pH : 7,0

Gula (%)	Inkubasi (jam)	YIELD (%)			Konsentrasi 1 (ppm)	Konsentrasi 2 (ppm)	Konsentrasi rata-rata (ppm)
		Area 1	Area 2	Area ave			
20	3	5,228	5,126	5,177	4,278.232	4,194.763	4,236.498
		6,089	5,998	6,044	2,747.744	2,706.679	2,727.212
	6	10,247	10,112	10,180	8,385.434	8,274.959	8,330.197
		6,561	6,498	6,530	2,960.740	2,932.310	2,946.525
	9	12,647	12,456	12,552	10,349.427	10,193.126	10,271.277
		8,701	8,654	8,678	3,926.444	3,905.235	3,915.839
	24	13,695	13,265	13,480	11,207.038	10,855.155	11,031.097
		9,080	9,006	9,043	4,097.473	4,064.079	4,080.776
	48	14,827	14,987	14,907	12,133.388	12,264.321	12,198.855
		9,303	9,326	9,315	4,198.105	4,208.484	4,203.295
	96	14,925	15,321	15,123	12,213.584	12,537.643	12,375.614
		9,679	9,770	9,725	4,367.780	4,408.845	4,388.313
144	15,238	15,112	15,175	12,469.722	12,366.612	12,418.167	
	9,850	9,751	9,801	4,444.946	4,400.271	4,422.609	
30	3	10,091	10,111	10,101	8,257.774	8,274.141	8,265.958
		9,036	9,000	9,018	4,077.617	4,061.372	4,069.495
	6	15,946	14,997	15,472	13,049.100	12,272.504	12,660.802
		10,662	11,005	10,834	4,811.372	4,966.155	4,888.764
	9	16,593	15,974	16,284	13,578.560	13,072.013	13,325.287
		10,985	11,000	10,993	4,957.130	4,963.899	4,960.515
	24	17,706	18,007	17,857	14,489.362	14,735.679	14,612.521
		11,909	12,015	11,962	5,374.097	5,421.931	5,398.014
	48	18,455	18,654	18,555	15,102.291	15,265.139	15,183.715
		11,744	11,789	11,767	5,299.639	5,319.946	5,309.793
	96	19,258	19,326	19,292	15,759.411	15,815.057	15,787.234
		13,925	13,489	13,707	6,283.845	6,087.094	6,185.469
144	19,843	19,647	19,745	16,238.134	16,077.741	16,157.938	
	14,142	13,648	13,895	6,381.769	6,158.845	6,270.307	
40	3	13,087	13,152	13,120	10,709.493	10,762.684	10,736.089
		16,553	16,842	16,698	7,469.765	7,600.181	7,534.973
	6	19,843	19,756	19,800	16,238.134	16,166.939	16,202.537
		16,664	16,785	16,725	7,519.856	7,574.458	7,547.157
	9	22,107	21,975	22,041	18,090.835	17,982.815	18,036.825
		18,490	19,024	18,757	8,343.863	8,584.838	8,464.351
	24	22,520	22,698	22,609	18,428.805	18,574.468	18,501.637
		18,864	18,962	18,913	8,512.635	8,556.859	8,534.747
	48	23,557	23,978	23,268	19,277.414	18,803.601	19,040.508
		21,233	21,963	21,598	9,581.679	9,911.101	9,746.390
	96	25,135	24,698	24,917	20,568.740	20,211.129	20,389.935
		28,783	29,075	28,929	12,988.718	13,120.487	13,054.603
144	27,169	27,985	27,577	22,233.224	22,900.982	22,567.103	
	28,546	29,115	28,831	12,881.769	13,138.538	13,010.154	

Digital Repository Universitas Jember

(lanjutan)

50	3	28,329	29,364	28,847	23,182.488	24,029.460	23,605.974
		36,229	35,698	35,964	16,348.827	16,109.206	16,229.016
	6	29,089	29,315	29,202	23,804.419	23,989.362	23,896.890
		37,961	36,956	37,459	17,130.415	16,676.895	16,903.655
	9	33,233	33,257	33,245	27,195.581	27,215.221	27,205.401
		38,067	38,147	38,107	17,178.249	17,214.350	17,196.300
	24	33,758	33,578	33,668	27,625.205	27,477.905	27,551.555
		39,586	39,685	39,636	17,863.718	17,908.394	17,886.056
	48	34,246	35,697	34,972	28,024.550	29,211.948	28,618.249
		40,235	39,789	40,012	18,156.588	17,955.325	18,055.957
	96	38,061	38,215	38,138	31,146.481	31,272.504	31,209.493
		41,225	40,125	40,675	18,603.339	18,106.949	18,355.144
	144	39,580	39,258	39,419	32,389.525	32,126.023	32,257.774
		41,789	41,263	41,526	18,857.852	18,620.487	18,739.170



Digital Repository Universitas Jember

Lampiran : 2

Data : Hasil Produksi Hetero-Galaktooligosakarida (ppm) Oleh Enzim β -Galaktosidase asal *Bacillus circulans* dengan Substrat Galaktosa (gula donor) dan Glukosa, Mannosa, Maltosa, dan Sukrosa (gula aseptor), dengan Konsentrasi Total Gula 50% g/ml, pada pH 6.0 dan 7.0 selama Waktu Inkubasi 3, 6, 9, 24, 48, 96, dan 144 jam.

Produksi Hetero-GalaktoOligosakarida

Donor	Aseptor	Produk	Disakarida	Trisakarida	Konsentrasi (ppm)	
Galaktosa	Glukosa	Galaktosil-glukosa	4,139	7,099	6,774	6,407
Galaktosa	Mannosa	Galaktosil-mannosa	4,240	7,507	6,939	6,775
Galaktosa	Maltosa	Galaktosil-maltosa	46,663	12,063	76,372	10,887
Galaktosa	Sukrosa	Galaktosil-sukrosa	6,096	6,801	9,977	6,138

Lampiran : 3

Kurva Standard Disakarida (Laktosa) dan Trisakarida (Raffinosa).

